

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**SISTEMA CANNABINOIDE Y REGULACIÓN NEUROINMUNE EN UN  
MODELO VIRAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE:**

**Estudio de la familia de citoquinas heterodiméricas IL-12/IL-23**

Tesis Doctoral

Fernando Gabriel Correa

Madrid, 2008



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia



**SISTEMA CANNABINOIDE Y REGULACIÓN NEUROINMUNE EN UN  
MODELO VIRAL DE ESCLEROSIS MÚLTIPLE:**

**Estudio de la familia de citoquinas heterodiméricas IL-12/IL-23**

Memoria presentada por

**Fernando Gabriel Correa**

para optar al grado de Doctor

VºBº de la Directora:

VºBº del Tutor:

**Dra. Carmen Guaza Rodríguez**

**Dr. Miguel Garzón García**

El interesado:

**Fernando Gabriel Correa**

**Instituto Cajal (CSIC)**







MINISTERIO  
DE EDUCACIÓN  
Y CIENCIA



CONSEJO SUPERIOR  
DE INVESTIGACIONES  
CIENTÍFICAS

INSTITUTO DE NEUROBIOLOGÍA  
"RAMÓN Y CAJAL"

Doña Carmen Guaza Rodríguez , Doctora en Ciencias Biológicas, Profesora de Investigación del Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC).

CERTIFICA:

Que la Tesis titulada: “Sistema cannabinoide y regulación neuroinmune en un modelo viral de esclerosis múltiple: estudio de la familia de citoquinas heterodiméricas IL-12/IL-23”, que se recoge en la presente memoria y de la que es autor FERNANDO GABRIEL CORRREA, ha sido realizada bajo mi dirección en el Departamento de Neurobiología Funcional y de Sistemas del Instituto Cajal (CSIC) y reúne las condiciones exigidas para su defensa.

Fdo. Dra. Carmen Guaza Rodríguez

Madrid,



Este trabajo ha sido financiado con ayuda  
del Ministerio de Educación y Cultura: SAF 2004/00416,  
y de la Comunidad de Madrid: S-SAL/0261/2006.

F. Correa ha sido financiado con  
una beca de la Fundación Carolina (enero 2003/diciembre 2004)  
y con una beca FPI de la Comunidad de Madrid (enero 2005/septiembre 2008)



A mis padres, Héctor y Elisa. A mis hermanos,  
Matías, Leandro, Ramiro y Laura.  
A Matilde.

A los eppendorfs caídos en el cumplimiento del deber.



*Hubiese querido más que esto y a la vez nada.*

*(Alejandra Pizarnik)*





## Agradecimientos y Reconocimientos.

La realización de una tesis doctoral rara vez corresponde a una única persona (aunque sea uno solo el que se enfrente al tribunal el día de su defensa). Por el contrario, en ella participa mucha gente: padres, hermanos, amigos, eventuales parejas, compañeros de laboratorio, compañeros de piso y por supuesto el/la directora/a de la tesis. Cada uno de ellos contribuye en distinta medida: padres y amigos dando apoyo y aliento cuando las cosas no van como uno quisiera; los compañeros de laboratorio dando sugerencias e ideas, dando ánimos cuando no salen los experimentos y alegrándose cuando por fin sí salen; los compañeros de piso soportando el cansancio y el malhumor de uno después de largas horas metidos en el laboratorio (o el no limpiar el salón porque justo ese finde tocaba ir al *labo* a trabajar) y, finalmente, los directores guiando, dando consejos y teniendo paciencia cuando los resultados de los experimentos tardan en aparecer. Valgan entonces estas breves líneas para expresar mi reconocimiento y agradecimiento a todos los que directa o indirectamente han participado y contribuido a que esta tesis llegara a buen término.

En primer lugar quisiera agradecer a la Dra. Carmen Guaza por haberme dado la oportunidad de realizar esta tesis bajo su dirección. Hace un tiempo atrás decidió arriesgarse recibiendo en su laboratorio a un becario que venía “del otro lado del charco”. Espero haber estado a la altura de sus expectativas, aunque más no sea parcialmente.

A todos los miembros del laboratorio C-05: a Pepe, por su inestimable ayuda y sus desinteresados consejos; a Joaquín por ser la alegría del *labo*, por sus inventos geniales y por aquella “caña” que me viene prometiendo desde hace un tiempo ya; a mis *compis* Leyre, Alessandra, Frida, Miriam y Eli, por los ratos de risa, por sus ayudas y sus consejos y por su paciencia en mis (numerosos) momentos de agobio y desesperación (sí Leyre, sí, tenés razón, soy un “Agonías”). Quiero agradecer además a dos ex del C-05: a Diego, por (intentar) transmitirme sus conocimientos de histología, por las tardes de café plagadas de charlas sobre ciencia, política y amores, por su cariño, pero muy especialmente por haberme introducido al apasionante mundo de los reyes eunucoides; y a Fabian, por haber sido mi mentor en el arduo camino de la biología molecular, por sus consejos, su continuo apoyo e interés por mis experimentos.

A toda la gente del Instituto Cajal, cuya función es la de facilitarnos el trabajo y que tengamos más tiempo para dedicarnos a la ciencia. Mención especial merece Chus, quien sin sus constantes llamados para que fuera “al cole” habría perdido más de un curso de doctorado o no hubiera continuado con las clases de francés.

*Une petite partie de cette thèse a été menée à terme dans le laboratoire du Dr. Dennis Vivien du Centre Cyceron, à Caen (France). Je veux exprimer mes grands remerciements à toute l'équipe du Dr. Vivien, spécialement à Farida, Amandine, Carine et Nathalie, pour leur gentil*

*accueil, pour les verres bus à la fin d'une longue journée de travail et pour m'avoir fait sentir comme si j'étais chez moi.*

Quisiera expresar mi gratitud al Dr. Christoph Becker de la Universidad de Mainz (Alemania) y al Dr. Stephen Smale del Howard Hughes Medical Institute (Estados Unidos) por el envío desinteresado de las construcciones del promotor de IL-12p40.

A mis padres y hermanos por su inagotable interés en mi tesis (tanto que aún después de cuatro años trabajando en el mismo tema continúan preguntándome: “¿qué era lo hacías?”), por su apoyo incondicional, sus ánimos, sus alientos, por quererme y respetarme tal cual soy. A mi familia extendida: padrinos, tíos y primos, los cuales continuamente me envían saludos, fuerzas y “buena onda” desde el otro hemisferio.

A tres personas fundamentales en esta etapa de mi vida: Sergio, Marina y Leandro. Cada uno, a su manera, ha sido para mí un hombro sobre el cual llorar mis penas, unas palmadas de ánimos en mi espalda en los momentos de frustración, un oído atento para escuchar mis problemas, una sonrisa enorme compartiendo mis momentos de alegría y un abrazo fuerte en cualquier ocasión. Muchas gracias chicos, por ser eso y mucho, mucho más.

A mis amigos de allende los mares: Ignacio, Florencia, Fabiana, Andrea, Pancha, Moni, Lillian, Paola, Fernanda y tantos otros, con quienes, por diferencias de uso horario o por nuestras respectivas situaciones personales o geográficas, se dificulta el contacto fluido, pero a los que llevo en el corazón a donde sea que vaya.

A los de aquende los mares: Onintza, Moisés, Ruth y la gente de “los jueves de cañas”. A “la Pretty” por enseñarme el verdadero significado de la palabra *valentía*. A mis *compis* de piso, Seán y Josefina por su paciencia para conmigo y en especial a Marcelo, por ayudarme con las figuras y esquemas de esta tesis. Y a los “inclasificables”, los de aquí y los que están repartidos por el mundo: gracias a todos por todos esos pequeños grandes momentos que son los que realmente cuentan.

Finalmente quisiera expresar mi reconocimiento a los profes de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Nacional de Córdoba que, siendo estudiante, me abrieron las puertas de sus laboratorios y me permitieron dar mis primeros pasos en este arduo camino de la ciencia.

## Abreviaturas

Nota: Dado el extendido uso de la lengua inglesa en el ámbito científico, en numerosas ocasiones se emplearán las abreviaturas correspondientes al inglés, ya que es de este modo como son más ampliamente conocidas.

2-AG	2-araquidonoilglicerol
AA-5HT	araquidonoilserotonina
ADNc	ácido desoxirribonucleico complementario
AEA	anandamida
APC	célula presentadora de antígenos
ARNm	ácido ribonucleico mensajero
CB <sub>1</sub>	receptor cannabinoide tipo 1
CB <sub>2</sub>	receptor cannabinoide tipo 2
COX-2	ciclooxigenasa tipo 2
EAE	encefalomielitis experimental autoinmune
EM	esclerosis múltiple
EP2	receptor prostanoide tipo 2
EP4	receptor prostanoide tipo 4
ERK1/2	quinasas 1 y 2 activadas por señales extracelulares
FAAH	enzima amidohidrolasa de ácido grasos
IFNβ	interferón-beta
IFNγ	interferón-gamma
IL	interleuquina
JNK	quinasa Jun N-terminal
LPS	lipopolisacárido
MAPK	proteína quinasa activada por mitógenos
Met-AEA	metanandamida
MHC II	complejo mayor de histocompatibilidad clase II
NK	células <i>Natural Killer</i>
NO	óxido nítrico
NOS-2	óxido nítrico sintasa tipo 2
PI3K	fosfatidil-inositol 3 quinasa
SNC	sistema nervioso central
SR1	SR141716A, antagonista del receptor cannabinoide CB <sub>1</sub>
SR2	SR144528, antagonista del receptor cannabinoide CB <sub>2</sub>
Th	célula T helper

THC	$\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol
TMEV	virus de la encefalomyelitis murina de Theiler
TNF- $\alpha$	factor de necrosis tumoral-alfa
TMEV-IDD	enfermedad desmielinizante inducida por el virus de Theiler
TRPV1	receptor vanilloide tipo 1

# ÍNDICE:

## SUMMARY

### INTRODUCCIÓN

1. Interacción entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.
  - 1.1 La microglía como componente esencial de la inmunidad innata dentro del SNC.
2. Neuroinflamación y patologías inflamatorias del SNC.
  - 2.1 La familia de citoquinas heterodiméricas como componentes esenciales del paso de la inmunidad innata a la adquirida dentro del SNC.
3. Esclerosis múltiple.
  - 3.1 Infección con el virus de Theiler como modelo de esclerosis múltiple.
  - 3.2 Neuropatología comparativa entre la TMEV-IDD y la EM.
  - 3.3 Cannabinoides y EM.
4. Sistema cannabinoide endógeno.
  - 4.1 Receptores.
  - 4.2 Ligandos.
  - 4.3 Biosíntesis y degradación de los endocannabinoides.
  - 4.4 Mecanismos de transducción de señal de los receptores cannabinoides.
  - 4.5 Fisiología del sistema cannabinoide endógeno.

### OBJETIVOS

### MATERIALES Y MÉTODOS

1. Animales.
  - 1.1 Inoculación de los animales con el virus de Theiler.
  - 1.2 Estudios conductuales.
  - 1.3 Tratamientos.
  - 1.4 Cirugía para la implantación de las minibombas osmóticas.
  - 1.5 Obtención de la médula espinal y su procesamiento para inmunohistoquímica.
  - 1.6 Inmunohistoquímica.
  - 1.7 Determinación de los niveles de endocannabinoides en médula espinal por HPLC-MS.
2. Cultivos celulares.
  - 2.1 Cultivos primarios.
    - 2.1.1 Cultivos de microglía de ratón.
    - 2.1.2 Cultivos de macrófagos peritoneales de ratón.
    - 2.1.3 Cultivos de microglía humana.
  - 2.2 Cultivos de líneas celulares.
  - 2.3 Tratamientos celulares.
  - 2.4 Infección *in vitro* de cultivos de microglía y de macrófagos con el virus de Theiler.
  - 2.5 Inmunocitoquímica.

- 2.6 Citometría de flujo.
- 3. Técnicas de inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western Blot).
- 4. Enzimoimmunoensayos en fase sólida (ELISAs).
- 5. Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).
  - 5.1 PCR convencional.
  - 5.2 PCR cuantitativa (qPCR).
- 6. Transfecciones.
  - 6.1 Plásmidos.
  - 6.2 Ensayo de luciferasa.
  - 6.3 Ensayo de oligonucleótidos señuelo (Decoy oligonucleotides assay).
- 7. Estadística.

## RESULTADOS

- 1. Efecto de los inhibidores de la recaptación de endocannabinoides, OMDM1 y OMDM2, en la encefalomiелitis por infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD) como modelo de esclerosis múltiple.
  - 1.1 El tratamiento con OMDM1 u OMDM2 mejora las funciones motoras en animales con deficiencias neurológicas establecidas.
  - 1.2 Los compuestos OMDM1 y OMDM2 reducen la activación de macrófagos/microglia *in vivo*.
  - 1.3 Los compuestos OMDM1 y OMDM2 modulan la activación macrofágico/microglial *in vitro*.
- 2. Efecto de la administración *in vivo* de AEA, metanandamida (Met-AEA) y del inhibidor de la FAAH, el araquidonoilserotonina (AA-5HT) en el modelo de Theiler.
  - 2.1 Patrón bifásico del curso temporal de expresión de las subunidades p35, p40 y p19 en la médula espinal de ratones infectados con TMEV.
  - 2.2 El tratamiento subcrónico con AEA, con Met-AEA o con AA-5HT reduce la expresión de los ARN mensajeros de las subunidades p35, p19 y p40 a los 90 días post-infección.
- 3. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de IL-12 e IL-23 por AEA.
  - 3.1 AEA limita la producción en microglía de IL-12 e IL-23 (y sus subunidades) en respuesta al TMEV y a LPS/IFN $\gamma$ .
  - 3.2 El agonista selectivo CB2 JWH-133 regula negativamente la expresión de IL-12p40.
  - 3.3 AEA regula de manera diferencial la expresión de IL-12 y de IL-23: participación de las vías de ERK1/2 y JNK.
  - 3.4 El aumento del tono endógeno de AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23.
- 4. AEA potencia la síntesis de IL-10: evidencias de una regulación autocrina de IL-10 endógena sobre la producción de IL-12.
  - 4.1 AEA potencia la producción de IL-10 inducida por la infección *in vitro* con TMEV y por LPS/IFN $\gamma$ : participación del receptor CB $_2$ .
  - 4.2 Mecanismos moleculares de acción de AEA sobre la producción de IL-10.
  - 4.3 La producción endógena de IL-10 regula de manera autocrina la síntesis de IL-12 e IL-23.
  - 4.4 El aumento del tono endógeno de AEA regula la expresión de IL-10.
- 5. Mecanismos independientes de receptores cannabinoides en la regulación de IL-12p40 por AEA.

5.1 Modificación de los niveles de CB2 en microglía activada.

5.2 AEA reduce la actividad del promotor de IL-12p40 mediante la activación del elemento represor GA-12 por un mecanismo independiente de receptores cannabinoides y vanilloides.

5.3 Interacciones entre AEA y COX-2: inhibición de la actividad del promotor de IL-12p40 por prostamida E2 y participación del receptor prostanoide EP2.

## DISCUSIÓN

1. Los cannabinoides modulan el proceso inflamatorio en patologías del SNC.
2. Los inhibidores de la recaptura de AEA, OMDM1 y OMDM2 modulan el proceso inflamatorio en TMEV-IDD.
3. La administración in vivo de AEA modula negativamente la expresión de IL-12 e IL-23.
4. AEA modula la expresión in vitro de IL-12 e IL-23 mediante la activación de las vías de ERK1/2 y JNK MAPKs, así como la inactivación de la vía de PI3K/Akt.
5. AEA regula la expresión de IL-12p40 mediante mecanismos independientes de receptores cannabinoides.

## CONCLUSIONES

## BIBLIOGRAFÍA

## PUBLICACIONES

1. Mestre L.\*, **Correa F.\***, Arévalo-Martín A., Molina-Holgado E., Valenti M., Ortas G., Di Marzo V. and Guaza C. "Pharmacological Modulation of the Endocannabinoid System in a Viral Model of Multiple Sclerosis". *J Neurochem*. 2005 Mar; 92(6):1327-39. \* **Igual contribución de los autores.**
2. **Correa F.**, Mestre L., Docagne F. y Guaza C. "Activation of cannabinoid CB2 receptor negatively regulates IL-12p40 synthesis in murine macrophages: Role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling". *Br J Pharmacol*. 2005 Jun; 145(4):441-8.
3. Ortega-Gutiérrez S., Molina-Holgado E., Arévalo-Martín A., **Correa F.**, Viso A., López-Rodríguez ML., Di Marzo V. y Guaza C. "Activation of the endocannabinoid system as therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis". *FASEB J*. 2005 Aug; 19(10):1338-40.
4. **Correa F.**, Docagne F., Clemente D., Mestre L., Becker C. y Guaza C. "Anandamide inhibits IL-12p40 production by acting on the promoter repressor element GA-12: possible involvement of the COX-2 metabolite, prostamide E2". *Biochem J*. 2008; 409(3):761-70.





## SUMMARY

There is a growing amount of evidence suggesting that cannabinoids may be neuroprotective in central nervous system inflammatory conditions. Advances in the understanding of the physiology and pharmacology of the endocannabinoid system have potentiated the interest in the cannabinoids as potential therapeutic drugs. The aim of the present work has been to study the actions of the endocannabinoid anandamide (AEA) on macrophages and microglial cells and their implications on multiple sclerosis (MS). AEA negatively regulates the production by microglial cells of the most important heterodimeric cytokines, IL-12 and IL-23, in the spinal cord of TMEV-infected mice, a viral model of MS (as well as their respective subunits: p35, p40 and p19), by both CB<sub>2</sub> receptor dependent and independent mechanisms. CB<sub>2</sub> receptor dependent signalling on IL-12/IL-23 regulation includes the activation of ERK1/2 and JNK MAPKs and the inhibition of the PI3k/Akt pathway, as well as the synthesis of the anti-inflammatory cytokine IL-10. CB<sub>2</sub> independent mechanisms include the participation of COX-2, oxygenating AEA into prostamide E<sub>2</sub>, activation of EP2 receptors and the subsequent activation of IL-12p40 promoter repressor, GA-12.

The pharmacological manipulation of the endocannabinoid system by targeting the AEA transporter or the inhibition of the main degradative enzyme, FAAH, is associated with a down-regulation of inflammatory responses in the spinal cord of TMEV-infected mice. In addition, AEA down-regulates the mRNA of p19, p35 and p40 in the viral model of MS.

The effects of endocannabinoids on the brain cytokine network and on the regulation of neuroinflammatory processes may affect chronic inflammatory demyelinating diseases such as multiple sclerosis.



# Introducción



## 1. Interacción entre el sistema nervioso central y el sistema inmune.

Históricamente se ha considerado al sistema nervioso central (SNC) como un espacio inmunológicamente privilegiado debido a:

1. La presencia de la barrera hematoencefálica (BHE) que constituye un impedimento físico a la entrada de células inmunes periféricas al parénquima nervioso.
2. La ausencia de vasos linfáticos.
3. La baja expresión de moléculas del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC, del inglés *major histocompatibility complex*) de clase I y II (Neumann y Wekerle, 1998).

La elevada expresión de moléculas proapoptóticas como Fas (CD95) y el ligando de Fas (FasL/CD95L) en células gliales que induce la apoptosis de las células inmunes que pudieran ingresar al parénquima nervioso en situaciones normales (Kohji y col., 1998).

De esta manera, la inmunovigilancia condicionada y las limitaciones que ofrece el SNC al desarrollo de una respuesta inmune adaptativa, derivadas de una adaptación evolutiva atribuida a la intrincada naturaleza de una red neuronal sumamente susceptible a las perturbaciones externas, ha contribuido al concepto del SNC como una estructura aislada. Sin embargo, este concepto no es del todo cierto, ya que existe una continua y estrecha interacción bidireccional entre el SNC y el sistema inmune (SI), de tal manera que factores solubles secretados por uno puede modificar las funciones del otro, estableciéndose una compleja comunicación que ha dado origen al desarrollo de un nuevo campo de estudio: la *neuroinmunología*.

El SNC cuenta con la capacidad de reconocer y generar una respuesta inflamatoria e inmune innata local contra el ingreso de potenciales antígenos exógenos (infección). Además, en determinadas situaciones (por ejemplo en la enfermedad de Alzheimer o en el ictus), el SNC dañado requiere de una intervención de la inmunidad innata para limitar el daño e iniciar la reparación tisular mediante la eliminación de cuerpos apoptóticos y otros restos celulares tóxicos (restos de mielina, fibras amiloides, etc.) (Gasque y col., 2000; Barnum, 2002; Nguyen y col., 2002; Wyss-Coray y Mucke, 2002). Para ello, es de vital importancia que tanto la glía como las neuronas tengan la capacidad de discriminar entre lo propio, lo foráneo, los materiales tóxicos y las células apoptóticas para eliminarlos, limitando así la reacción inflamatoria local. De esta manera, y de acuerdo al concepto originalmente expuesto por Medzhitov y Janeway (2002), existe una plétora de señales de “cómeme” (*“eat me” signals*) expresadas por patógenos y células apoptóticas o necróticas, capaces de ser reconocidas por células de la glía, en particular por la microglía (Gardai y col., 2006). Estas señales se agrupan en un conjunto heterogéneo de moléculas conocidas como “patrones moleculares asociados a patógenos” (PAMPs, del inglés *pat-*

*hogen-associated molecular patterns*) y que se caracterizan por estar altamente conservadas durante la evolución y no estar sometidas a la variabilidad antigénica (Gasque y col., 2000). Estos PAMPs son estructuras microbianas que al ponerse en contacto con elementos del sistema inmune innato del hospedador disparan una serie de respuestas protectoras tendientes a eliminar al patógeno por fagocitosis, siendo un ejemplo típico de este tipo de moléculas el lipopolisacárido de la membrana externa de bacterias Gram negativas (LPS). En analogía con los PAMPs, se ha propuesto la existencia de “patrones moleculares asociados a células apoptóticas (ACAMPs, del inglés *apoptotic cell-associated molecular patterns*) expresados *de novo* por células que están experimentando la muerte celular programada (Franc y col., 1999; Gasque y col., 2000; Gregory, 2000). Estos ACAMPs tendrían un papel de suma importancia en procesos como el desarrollo embrionario del SNC, ya que se encargarían de eliminar a las poblaciones celulares que sufren apoptosis a fin de limitar al máximo los restos celulares (Imler y Hoffmann, 2002).

Finalmente, las células fagocíticas reconocen estos PAMPs y ACAMPs a través de “receptores de reconocimiento de patrones” (PRRs, del inglés *pattern recognition receptors*) tanto solubles como asociados a membrana (Gregory, 2000; Parnaik y col., 2000). Por lo tanto, y de forma similar a la inmunidad adquirida, la inmunidad innata es extremadamente selectiva en su capacidad de distinguir las células propias sanas de aquellas potencialmente peligrosas (desde patógenos a restos celulares) de acuerdo a sus señales de “no-identidad”. La activación de cada PRR producirá una respuesta diferencial, de acuerdo al estímulo que le dio origen. Así, si una célula microglial encuentra a un patógeno, ésta se activará y producirá citoquinas proinflamatorias y quimiocinas que iniciarán el reclutamiento de fagocitos y células presentadoras de antígeno (APCs, del inglés *antigen presenting cells*) comprometiéndolas en una respuesta inmune de tipo adquirida más eficiente. Por otro lado, si el fagocito encuentra una célula en apoptosis o restos celulares tóxicos, por ejemplo durante un proceso isquémico cerebral, éste se activará produciendo citoquinas antiinflamatorias así como factores de crecimiento que contribuyan a la reparación tisular.

Así como existen señales capaces de potenciar la respuesta del sistema inmune innato dentro del SNC, existen mecanismos de silenciamiento que limitan dicha respuesta (Medzhitov y Janeway, 2002). Las neuronas expresan moléculas de membrana y secretan mediadores solubles que funcionan como señales de “no me comas” (“*don't eat me*” *signals*) que controlan la actividad fagocítica de los macrófagos, induciéndolos hacia una reacción inflamatoria restaurativa con la producción de citoquinas antiinflamatorias y factores de crecimientos involucrados en la reparación tisular. Así, estas señales de “no me comas” se agrupan en una familia heterogénea de moléculas denominada “patrón mole-

cular de auto-reconocimiento” (SAMPs, del inglés *self-associated molecular patterns*) y que podrían interactuar con los PRRs, modulando negativamente la inmunidad innata (Elward y Gasque, 2003). Los SAMPs están expresados en prácticamente todas las células “propias” y no en los patógenos. Sin embargo, esta “identidad” puede perderse. De esta manera, una célula “propia” puede ver modificada la expresión de algunos SAMPs (por ejemplo, de la expresión de ácido siálico) durante el curso de una infección viral, modificación que puede activar a una célula microglial promoviendo la fagocitosis de la misma (Fig. 1).

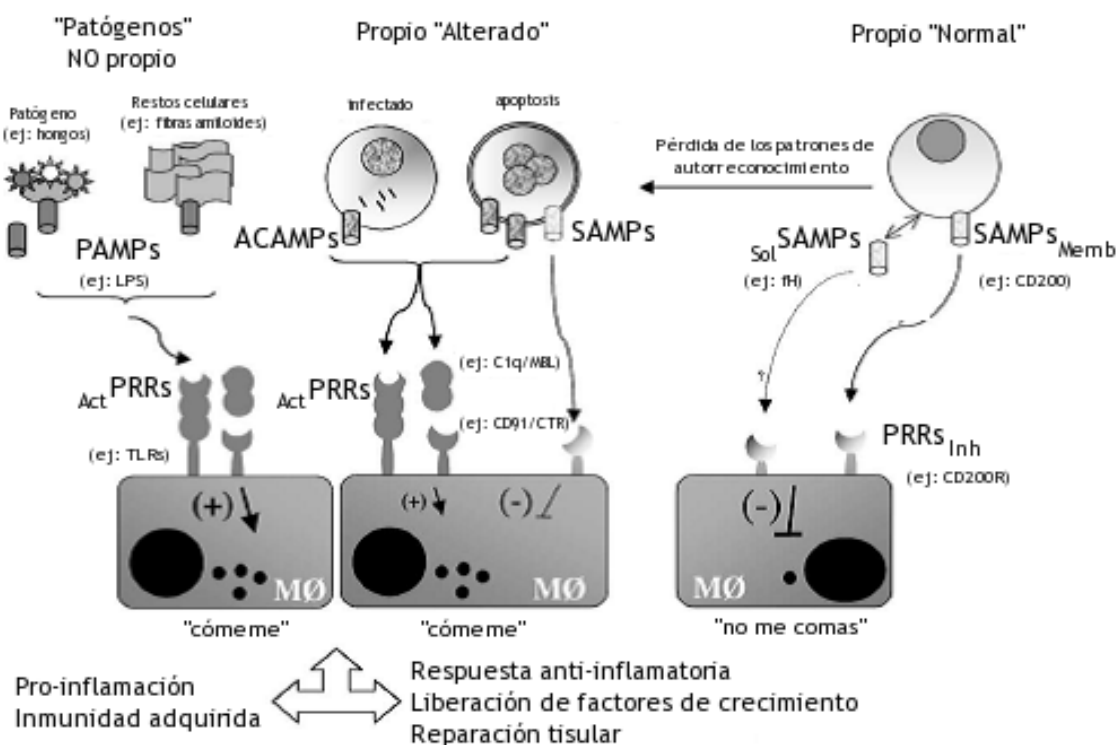


Figura 1: Papel de las señales “no me comas” y “cóme” en la respuesta inmune innata. (Modificado de Elward y Gasque, 2003).

Las neuronas también contribuyen a regular la activación de la respuesta inmune innata. Las interacciones locales entre neuronas y células gliales pueden estar mediadas por varios mecanismos: mediadores solubles, acoplamiento eléctrico indirecto debido a cambios en la concentración iónica del medio, moléculas de adhesión celular, etc. En este sentido, la expresión de ciertos receptores de membrana en las neuronas controla la activación de la microglía a través de una estrecha interacción neurona-glía. La glicoproteína neuronal de membrana CD200 interactúa con su receptor, el CD200R, expresado en microglía inhibiendo la activación de la misma y manteniéndola en un estado de quiescencia (Hoek y col., 2000). Los neurotransmisores y neurotrofinas liberados durante la

actividad eléctrica normal de las neuronas también contribuye a limitar la activación de células gliales. Así, la liberación de glutamato por parte de neuronas excitatorias inhibe la inducción de la expresión de moléculas de MHC clase II en astrocitos (Lee y col., 1992). Resultados similares se obtuvieron con norepinefrina y con el péptido intestinal vasoactivo (VIP, del inglés *vasoactive intestinal polypeptide*) (Frohman y col., 1988). Las neurotrofinas factor de crecimiento nervioso (NGF, del inglés *nerve growth factor*), factor de crecimiento derivado de cerebro (BDNF, del inglés *brain-derived growth factor*) y en menor medida la neurotrofina-3 (NT-3) fueron capaces de revertir la inducibilidad de MHC clase II en microglía (Neumann y Wekerle 1998). NGF fue capaz de inhibir incluso la expresión de moléculas coestimuladoras como B7-2 (CD68) en cultivos primarios de microglía de rata (Wei y Jonakait, 1999). Es decir que las neuronas normales fisiológicamente activas tienen en general un efecto supresor sobre la activación de la glía previniendo y limitando el desarrollo de una respuesta inflamatoria.

### 1.1 La microglía como componente esencial de la inmunidad innata dentro del SNC.

En el organismo, todos los tejidos presentan una población de macrófagos residentes que son la primera línea de defensa frente a la inflamación. En el SNC, la microglía constituye esa población residente de macrófagos y está relacionada morfológica, fenotípica y funcionalmente a las células de estirpe mieloide (Stoll y Jander; 1999; Aloisi y col., 1998; Chan y col., 2007). De esta manera, comparte muchos marcadores fenotípicos con los macrófagos, haciendo que la distinción entre ambos tipos celulares sea difícil. Las células microgliales son células pequeñas, altamente ramificadas y homogéneamente distribuidas en todo el parénquima nervioso. Representan cerca de un 10% de la población celular total de la glía en el SNC adulto (Vaughan y Peters, 1974), ubicándose en vecindad a las neuronas en la sustancia gris y entre tractos de fibras en la sustancia blanca (Lawson y col., 1990) desde donde vigilan continuamente el microambiente cerebral en busca de lesiones o patógenos (Davalos y col., 2005; Nimmerjahn y col., 2005). Además existe un tipo especializado de microglía, la microglía perivascular, que se halla en contacto estrecho con las capilares cerebrales y cuyo origen proviene del continuo recambio de macrófagos periféricos que se ubican en esa zona (Graeber y col., 1998).

Según Schwartz y col. (2006), la microglía en reposo debería considerarse más bien como células con potencial “macrófago-símil”, dado que el estado de reposo se caracteriza por una morfología ramificada y una baja expresión de moléculas asociadas con la función macrofágica. El paso de microglía en reposo a una célula “macrófago-símil” requiere una transformación provocada por un estímulo adecuado. Sin embargo, la microglía en

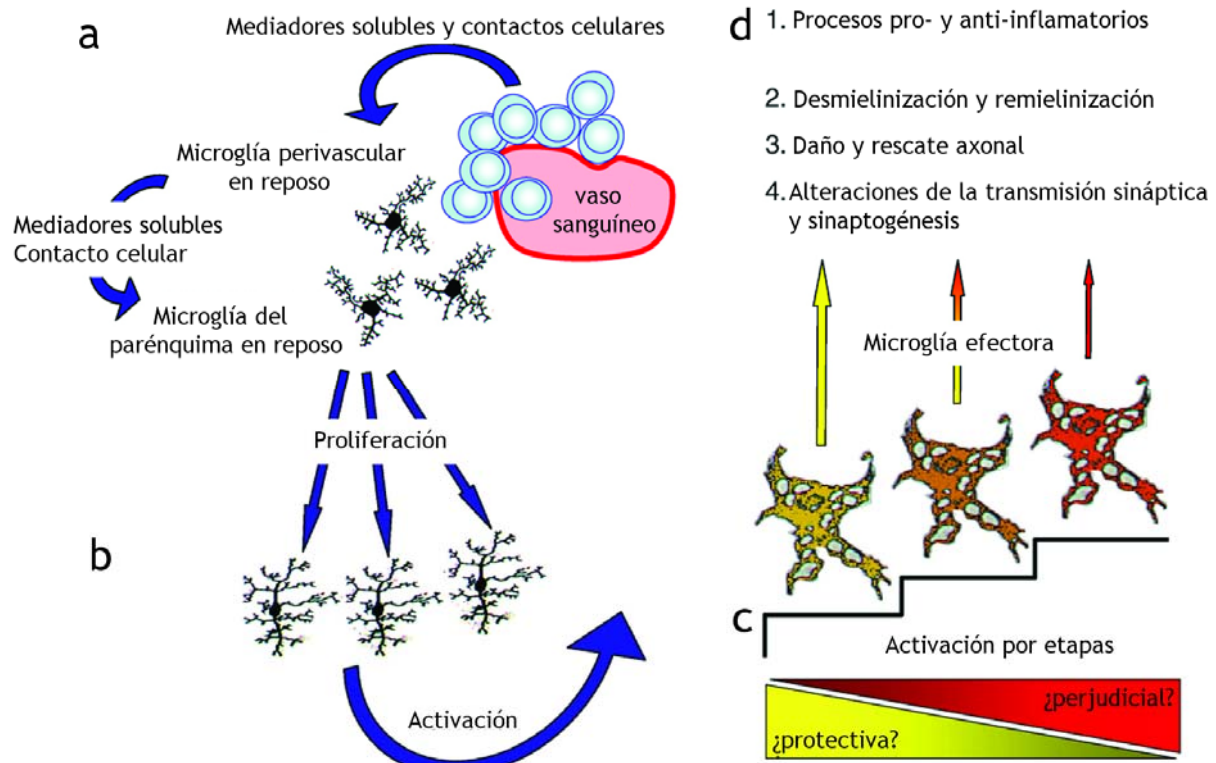


reposo, lejos de estar inactiva, está constantemente detectando los posibles cambios que puedan producirse en su microentorno y preparadas para atacar y eliminar cualquier amenaza a la integridad tisular. Así, la microglía puede detectar las alteraciones homeostáticas en la forma de alteraciones en la composición bioquímica o en la organización estructural del medio. La microglía es capaz de diferenciar aquellos cambios que pueden ser tolerados por el SNC y que por lo tanto son benéficos o neutros de aquellos que no pueden ser tolerados y por lo tanto son dañinos.

Una vez que la microglía ha detectado un cambio patológico, la presencia de un antígeno exógeno o una lesión del parénquima nervioso, ésta cambia de morfología, re trayendo sus procesos e incrementando su volumen. Esta forma se conoce como “microglía activada” o “microglía reactiva” (Fig. 2). Este cambio morfológico va asociado a un cambio fenotípico, como el aumento en la expresión de moléculas de MHC clase I y II, y moléculas coestimuladoras, necesarias para la presentación antigénica a células T (Hickey y Kimura, 1988; Kreutzberg, 1996), síntesis de intermediarios reactivos de nitrógeno y oxígeno, enzimas proteolíticas, metabolitos del ácido araquidónico y citoquinas como TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  (Banati y col., 1993; Renno y col., 1995; Kreutzberg, 1996; Chabot y col., 1997).

Durante mucho tiempo se ha pensado que, independientemente del tipo o del contexto de un estímulo dañino, la microglía reaccionaba de una manera estereotípica, exhibiendo un programa predeterminado de funciones ejecutivas. Si bien diversas evidencias experimentales apoyan la noción de que algunas características de la respuesta microglial pueden originarse en un centro de un programa “multipropósito”, la mayoría de estas evidencias provienen de experimentos *in vitro*, lo cuales no pueden reflejar la complejidad del entorno fisiológico en las respuestas microgliales *in vivo*. En contraposición, el concepto de “respuesta adaptativa” discrimina entre las señales de peligro, los factores exógenos (agentes infecciosos) de aquellos endógenos (células o tejidos dañados, moléculas alteradas o desajuste en los niveles de neurotransmisores). La toxicidad endógena (bajo el concepto del “enemigo interno” de Schwart, 2003) puede resultar de la ruptura de membranas celulares, la presencia extracelular de componentes citosólicos, agregados moleculares anormalmente procesados (como el  $\beta$ -amiloide) o niveles excesivos de neurotransmisores (como el glutamato). En este contexto, la activación microglial puede resultar beneficiosa para el SNC lesionado al eliminar los restos celulares (Rapalino y col., 1998), mediante la producción de citoquinas y factores neurotróficos (Hammarberg y col., 2000; Kipnis y col., 2000) y promoviendo la regeneración axonal (Fitch y col., 1999; Ousman y David, 2001).

La microglía responde diferencialmente al mismo estímulo dependiendo de si otro



**Figura 2: Modelo de activación microglial por etapas en EM (“modelo cuántico”).** La microglía perivascular (a) alerta a la microglía del parénquima acerca de potenciales señales de daño, provenientes de las células inmunes periféricas que infiltran el SNC. Como consecuencia, la microglía del parénquima comienza a proliferar y a activarse para adquirir el fenotipo necesario para eliminar al agente agresor y restaurar la integridad del SNC. (b) Los diferentes estados de activación que pueden ser alcanzados por la microglía dependen de las señales que reciba y de cómo éstas interaccionen entre sí. Una serie de mecanismos de retroalimentación positiva vs. negativa se postulan como reguladores de dicha activación por etapas y que determinan, en conjunto, en efecto protector o perjudicial de las funciones efectoras de la microglía (c). La consecuencia de este “modelo cuántico” es que la activación y proliferación microglial no caracteriza exclusivamente a la microglía “perjudicial” mientras que la microglía en reposo no puede ser considerada, *per se*, protectora. Siendo una célula funcionalmente plástica, la microglía puede hacer frente a numerosos procesos -tanto protectores como perjudiciales- como inflamación, desmielinización, daño axonal y plasticidad sináptica (d). (Modificado de Muzio y col., 2007).

estímulo lo precede o antecede, lo cual sugiere que la conducta microglial está dictada por un fenotipo adquirido más bien que estereotípico. De esta manera, el *priming* (precondicionamiento en el cual el primer estímulo prepara a la célula para una respuesta potenciada a la segunda señal), el *priming negativo* (desensibilización) y la interferencia (donde el segundo estímulo ejerce una especie de “veto” sobre la respuesta en marcha de la primera señal) ejercen diferentes efectos sobre el resultado final. La interacción entre las dos señales es más compleja aún cuando el intervalo entre las dos señales (la “memoria celular”) varía (Häusler y col., 2002; Butovsky col., 2005). Así, la llegada de un segundo estímulo modifica al primero no sólo en magnitud sino también en calidad. Por lo tanto, la variabilidad en la activación microglial no es meramente un reflejo de la fuerza o persistencia del estímulo, sino que está más bien determinada por la naturaleza y contexto de todos los estímulos, y de las vías de señalización intracelular que ellos activan (Shaked y col., 2004; Butovsky y col., 2005).

## 2. Neuroinflamación y patologías inflamatorias del SNC.

Aunque la respuesta inmune innata en el SNC pueda tener efectos negativos, también posee efectos beneficiosos. Tan pronto como a los 15 minutos después de un trauma agudo en el SNC se producen citoquinas proinflamatorias, seguidas de una producción temporal de factores neurotróficos (Nguyen y col., 2002). Este perfil sugiere un papel potencial de la respuesta inflamatoria en el inicio de la fase de la respuesta neurotrófica. TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  son dos de las principales citoquinas que se detectan en la microglía parenquimal a lo largo del sitio de lesión. En particular, IL-1 $\beta$  juega un papel importante en la expresión de NFG, factor neurotrófico ciliar (CNTF, del inglés *ciliar neurotrophic factor*) y del factor de crecimiento insulino-símil (IGF-1, del inglés *insulin-like growth factor*) por parte de astrocitos, factores que inician y promueven la reparación del SNC lesionado (Nguyen y col., 2002). TNF $\alpha$  parecería tener una doble función en situaciones de daño del SNC. Se han descrito tanto efectos adversos como beneficiosos durante el daño cerebral en distintas situaciones patológicas. Aún más, se ha demostrado que TNF $\alpha$  cumple un papel fundamental en el inicio de la remielinización vía activación del receptor TNF-2 (TNFR-2) pero no del TNFR-1 (Arnett y col., 2001). Más aún, los ratones *knock-out* para TNF $\alpha$  poseen una remielinización significativamente más lenta, la cual se asocia a una reducción en el pool de progenitores de oligodendrocitos proliferantes y a una disminución en el número de oligodendrocitos maduros (Arnett y col., 2001). A su vez, se ha visto que TNF $\alpha$  puede dañar a las neuronas, en especial si actúa en sinergia con IFN $\gamma$  (Jensen y col., 2000).

Se ha observado activación microglial y síntesis de citoquinas en distintas patologías del SNC que cursan con neuroinflamación: enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), esclerosis múltiple (EM) y esclerosis lateral amiotrófica (ELA) (Nguyen y col., 2002). El papel de las citoquinas producidas en estas patologías no está del todo claro y en muchos casos, dependiendo del modelo utilizado, los efectos son beneficiosos o perjudiciales.

En determinadas patologías inflamatorias del cerebro, como EM o infecciones virales o bacterianas del SNC, ocurren cambios que permiten una defensa específica y eficiente contra patógenos y que contribuyen a la cura del mismo (Neumann y Wekerle, 1998). Así, cambios en la expresión de moléculas no-permisivas que normalmente regulan negativamente la inmunovigilancia del SNC por parte de linfocitos, permiten un mayor ingreso de células T al parénquima nervioso (Hickey, 2001). Pero para el inicio de una respuesta inmune adquirida potente capaz de eliminar al patógeno se requiere la presencia de células presentadoras de antígenos (APCs, del inglés *antigen presenting cells*) “profesionales”. La

microglía en reposo expresa bajos niveles de moléculas de MHC II y de moléculas coestimuladoras, por lo que en condiciones basales no funcionan como APCs “profesionales” sino más bien como “facultativas” (Schwartz y col., 2006). Por otra parte, existe una población de microglía/macrófagos perivasculares que se recambian continuamente por macrófagos periféricos y que penetran a través de la BHE en situaciones normales (Bechmann y col., 2001). Estas células poseen una mayor expresión de moléculas MHC II y moléculas coestimuladoras y por su ubicación especial pueden captar antígenos del parénquima nervioso y presentárselos a los linfocitos T periféricos (Ford y col., 1995). Además, las señales provenientes de citoquinas proinflamatorias inducen un aumento en la expresión microglial de estas moléculas (De Simone y col., 1995), revirtiendo el efecto negativo que tienen las neurotrofinas sobre las mismas (Wei y Jonakait, 1999).

Por otro lado, los astrocitos inducen la expresión de MHC II pero no de moléculas coestimuladoras, por lo que se ha hipotetizado que este tipo celular induciría la anergia en los linfocitos T activados (Aloisi y col., 2000). Además, los astrocitos producen IL-10 y el factor de crecimiento transformante  $\beta$  (TGF- $\beta$ ), citoquinas que actúan como antiinflamatorias, regulando así la respuesta inmunitaria. Sin embargo, y paradójicamente, en procesos inflamatorios, los astrocitos secretan agentes quimiotácticos como la proteína quimiotáctica de monocitos-1 (MCP-1, del inglés *monocytes chemotactic protein-1*) y la proteína-10 inducida por IFN $\gamma$ , las cuales reclutan a monocitos/macrófagos y células T en áreas afectas del tejido nervioso (Ransohoff y Tani, 1998).

El tipo de células T activadas que penetran al SNC pueden tener dos fenotipos: Th1, inducida principalmente por IL-12 y orientada hacia la eliminación de patógenos intracelulares; y Th2, inducida principalmente por IL-10 e IL-4, orientada a la eliminación de patógenos extracelulares. Existe un tercer fenotipo de células CD4<sup>+</sup>, Th-17, cuyo mantenimiento y compromiso se deben principalmente a IL-23, la cual está muy relacionada al desarrollo de patologías autoinmunes (Röhn y col., 2006; Sonderegger y col., 2006; Uytendhove y van Snick, 2006). Por otro lado se ha propuesto que linfocitos T CD4<sup>+</sup> autorreactivos protegen a las neuronas dañadas de una degeneración secundaria, aún cuando el perfil exacto de las citoquinas neuroprotectoras no se conoce muy bien (Moalem y col., 1999). Asimismo se ha mostrado que los linfocitos T pueden secretar factores neurotróficos que pueden estar involucrados en los efectos protectores de estas células autorreactivas (Kerschensteiner y col., 1999).

En contraste con las células T CD4<sup>+</sup> que podrían ejercer algún efecto protector y antiinflamatorio, el tejido nervioso es muy susceptible al efecto citotóxico de las células T CD8<sup>+</sup>. El reconocimiento antigénico presentado vía MHC I dispara tres importantes mecanismos para eliminar a la diana (Trapani y col., 2000): la secreción de gránulos citotóxicos

que contienen perforina y serino-proteasas, la expresión del FasL y la expresión de citoquinas citotóxicas de la familia de TNF. Sin embargo, el SNC parece tener mecanismos protectores frente al ataque no deseado por parte de las células T CD8<sup>+</sup>, aunque aún estos no están bien definidos. Como se mencionó anteriormente, las neuronas expresan constitutivamente FasL, el cual induce apoptosis en células T. Además, las neuronas estimuladas para expresar MHC I están parcial y selectivamente protegidas del ataque por parte de las células T CD8<sup>+</sup>, ya que sólo muestran ligeras alteraciones en sus neuritas (Medana y col., 2001).

## 2.1 La familia de citoquinas heterodiméricas como componentes esenciales del paso de la inmunidad innata a la adquirida en el SNC.

La familia de citoquinas heterodiméricas constituye un grupo de citoquinas estructural y genéticamente relacionadas, formada por IL-12, IL-23 e IL-27. Son producidas principalmente por células de estirpe mieloide, como macrófagos, monocitos y células dendríticas. Dentro del SNC, la microglía activada es la principal productora de estas citoquinas (Li y col., 2003; Sonobe y col., 2005) (Fig 3).

La citoquina IL-12 está constituida por dos subunidades, p40 y p35, unidas por puentes disulfuro, constituyendo una proteína de 70 kDa (Stern y col., 1990; Wolf y col., 1991). Mientras que la expresión de p35 es ubicua, la de p40 está altamente regulada y restringida a células que producen IL-12 biológicamente activa (D'Andrea y col., 1993). IL-12 es una citoquina clave en la regulación de una respuesta inmune Th1 al unirse y señalizar a través de su receptor de alta afinidad IL-12R, constituido por dos cadenas, B1 constitutiva y por B2 inducible, la cual está restringida a las células T activadas y las células NK (*Natural Killer*). Después de que IL-12 se une a su receptor, induce la activación de miembros específicos de la familia STAT (del inglés *signal transducers and activators of transcription*), en particular STAT-3 y STAT-4, los cuales a continuación translocan al núcleo y se unen a secuencias genómicas promotoras, incluyendo las que controlan a IFN $\gamma$  (Jacobson y col., 1995). En este sentido, IL-12p35/p40 induce fuertemente la diferenciación de linfocitos T “vírgenes” hacia células efectoras Th1.

Recientemente se ha demostrado que IL-12p40 puede formar una nueva citoquina, denominada IL-23, al unirse a la subunidad p19, la cual está genéticamente relacionada a p35 (Oppmann y col., 2000; Trinchieri y col., 2003). IL-23 exhibe actividades biológicas similares a, así como distintas de, IL-12 (Belladonna y col., 2002). En particular, IL-23 activa preferencialmente a linfocitos T de memoria y, recientemente, se la ha implicado en el mantenimiento y la expansión de células del linaje Th-17, las cuales a su vez secretan

una nueva citoquina, denominada IL-17. Así, el receptor de IL-23 está altamente expresado en células T de memoria y consiste en las cadenas IL-12B1 y de una nueva cadena, llamada IL-23R (Parham y col., 2002). IL-23 señaliza vía Jak2 y activa a STAT-3, STAT-4 y STAT-5, aunque la activación de STAT-4 es significativamente más débil que en la señalización de IL-12. La importancia de IL-23 en enfermedades inflamatorias crónicas ha quedado demostrada por experimentos donde ratones transgénicos que sobreexpresan p19 mostraban una inflamación multiorgánica y muerte prematura (Wiekowski y col., 2001).

IL-27 está formada por las subunidades p28 (estrechamente relacionada a IL-12p35) y EBI-3 (del inglés *Epstein-Barr-induced gene 3*; y estrechamente relacionada a IL-12p40). IL-27 induce la proliferación de linfocitos T CD4<sup>+</sup> y su preactivación, a través de su receptor WSX-1/TCCR (Pflanz y col., 2002). Además IL-27 actúa en sinergia con IL-12 en las células T para que éstas produzcan IFN $\gamma$ .

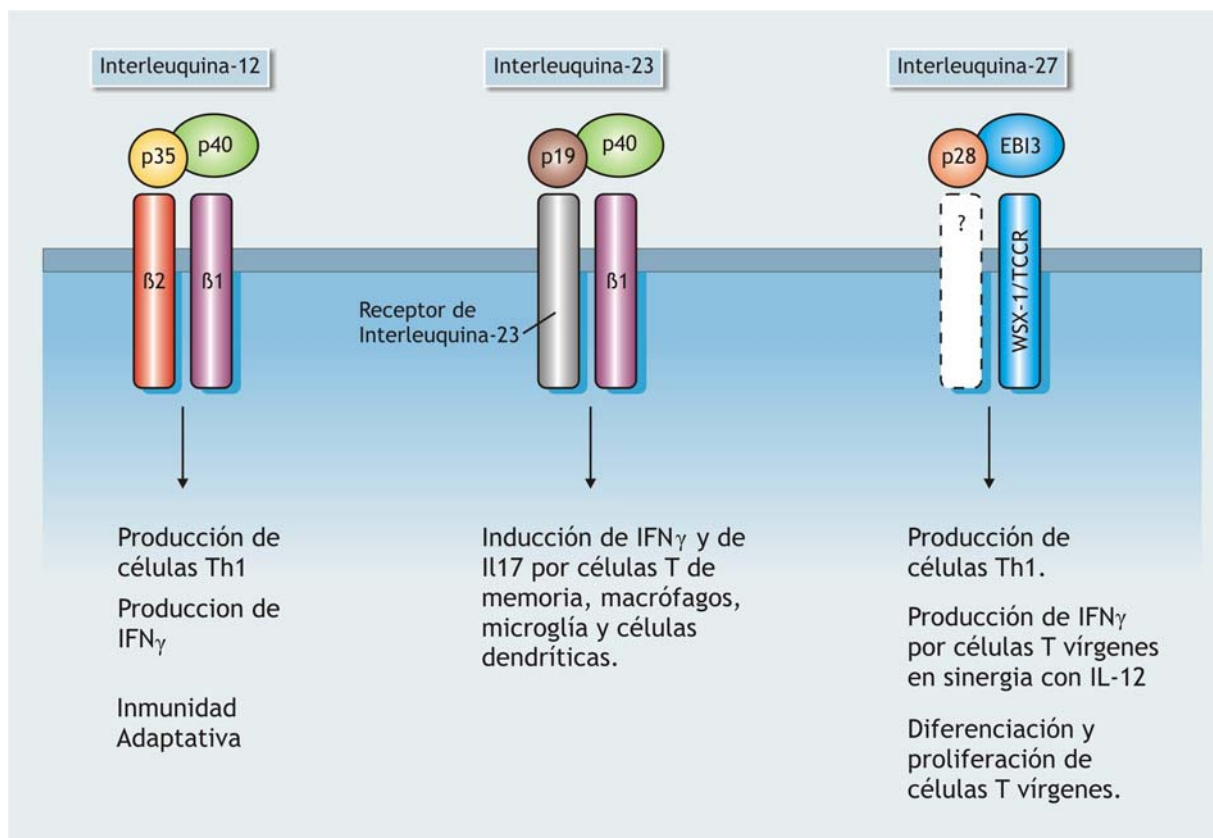


Figura 3: Representación esquemática de la familia de citoquinas heterodiméricas, sus receptores y sus principales funciones. Adaptado de Trinchieri, 2003.

El papel de estas citoquinas heterodiméricas en la inflamación crónica y las patologías autoinmunes, en particular de IL-12 e IL-23, ha sido demostrado en diversos modelos animales de autoinmunidad, como la artritis inducida por colágeno (McIntyre y col., 1996; Matthys y col., 1998; Murphy y col., 2003), uveítis experimental autoinmune (Tarrant y col., 1998), durante la fase efectora de la encefalomiелitis experimental autoinmune

(Becher y col., 2002; Cua y col., 2003), en la diabetes autoinmune (Trembleau y col., 2003), en la enfermedad inflamatoria intestinal (Schmidt y col., 2005), etc., donde se ha visto una sobreproducción de estas citoquinas (Fig. 4).

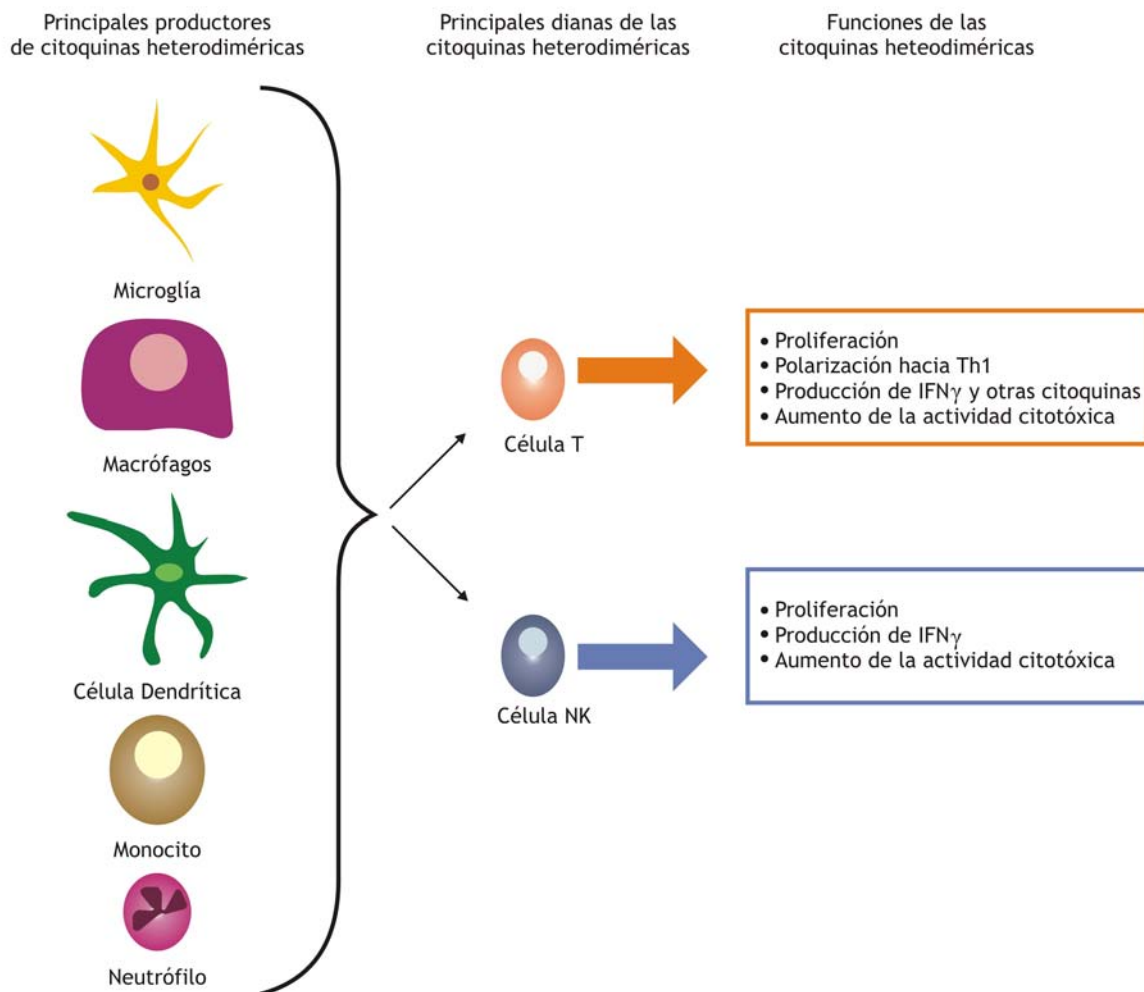


Figura 4: Representación esquemática de las principales células productoras, dianas y funciones de las citoquinas heterodiméricas. Adaptado de Trinchieri, 2003.

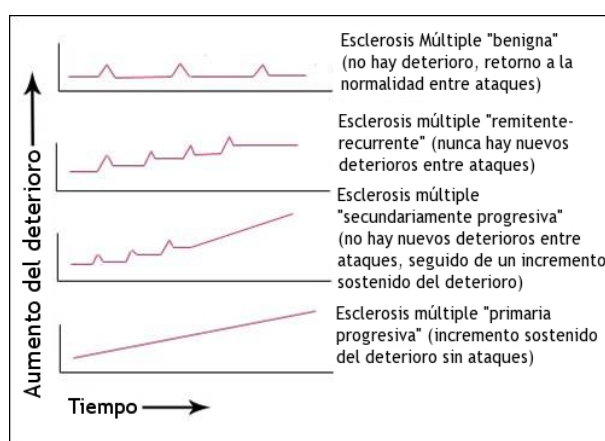
En los últimos años se ha prestado mayor atención al papel de IL-23 en la patogénesis de la esclerosis múltiple. Parte de estas observaciones proviene de experimentos con ratones *knock out* para p19, los cuales mostraban resistencia a desarrollar EAE (Cua y col., 2003). Así, la producción de IL-23 por parte de la microglía es crítica para la patogénesis de dicha patología (Becher y col., 2002; Gran y col., 2002; Cua y col., 2003). El tratamiento con anticuerpos anti-p19 reduce los niveles séricos de las citoquinas proinflamatorias y previene la recaída de la EAE al inhibir la expansión de epítomos (Chen y col., 2006). Parte de los efectos de IL-23 en la patogénesis de la EAE se deben a que esta citoquina, como se comentó anteriormente, contribuye al mantenimiento de una nueva subpoblación de células T, ThIL-17, la cual se caracteriza por la expresión de IL-17, IL-6 y TNF y que tiene una fuerte capacidad de dañar el tejido del SNC (Aggarwal y col., 2003;

Harrington y col., 2005; Langrish y col., 2005; Bettelli y col., 2006). Además se ha descrito que existe un aumento en la expresión de p19 en la microglía que rodea a las lesiones activas en muestras de cerebro de pacientes con esclerosis múltiple (Li y col., 2007).

### 3. Esclerosis múltiple.

La esclerosis múltiple (EM) es una enfermedad crónica desmielinizante del SNC. Se caracteriza por la aparición de lesiones de carácter inflamatorio donde lo más llamativo es la destrucción de la mielina con una total o relativa preservación de las neuronas y sus prolongaciones. De forma secundaria ocurre un fenómeno de reparación, cicatrización o gliosis, configurándose la lesión característica de la enfermedad, la placa de tamaño variable (1 mm a 4 cm) y de localización preferentemente periventricular.

Es la enfermedad neurológica más frecuente en adultos jóvenes en Europa y Norteamérica, constituyendo una de las principales causas de invalidez. Se inicia por una alteración sensitiva, motora, visual (pérdida de la visión, diplopia), vértigo o trastornos esfinterianos, cursa ya sea con brotes, con remisiones-exacerbaciones, ya sea de forma progresiva (primaria o secundaria) (Fig. 5). Los signos y síntomas son muy variados, incluyendo afectación de pares craneales, oftalmoplejía internuclear, diplopía, neuritis óptica, signos piramidales, paraparesia, espasticidad, parestesias, dolor, trastornos cerebelosos, trastornos esfinterianos, trastornos afectivos y ocasionalmente trastornos paroxísticos (neuralgia del trigémino, epilepsia). Las causas más frecuentes de invalidez son la paraparesia espástica, las alteraciones de coordinación, los trastornos esfinterianos y el deterioro intelectual.



**Figura 5: Esquema del progreso del deterioro en las distintas formas de esclerosis múltiple.**

En los primeros años de la enfermedad, el 80-90% de los pacientes presentan la forma remitente-recurrente (EMRR), caracterizada por la aparición de brotes o recaídas y períodos variables de remisión (Lublin y Reingold, 1996). Algunas formas de EMRR tienen un curso benigno con pocos brotes, sin que se produzca discapacidad a lo largo de muchos



años (Confavreux y col., 1980; Weinshenker y col., 1989). Por el contrario, alrededor de un 40% de los pacientes que debutan con EMRR desarrollan una forma secundariamente progresiva (EMSP) a los 10 años, caracterizada por un continuo empeoramiento de los síntomas sin brotes sobreañadidos (Weishenker y col., 1989). Aproximadamente un 10-15% de los pacientes debutan con un curso progresivo, recibiendo esta forma el nombre de primariamente progresiva (EMPP). Posee unas características clínicas que la diferencian de la EMRR como: una aparición más tardía, igual proporción de hombres que de mujeres afectados y clínicamente cursan con una paraparesia espástica de progresión lenta (Thompson y col., 1997; Thompson y col., 2000) o más raramente con cuadros progresivos de hemiparesia, pérdida visual o afectación del tronco y cerebelo. Los hallazgos de resonancia magnética nuclear de cerebro y médula espinal muestran un menor número de placas que otras formas de EM (Thompson y col., 1997). Esto ha llevado a algunos autores a sugerir que quizás tenga una etiopatogenia diferente.

Si bien la EM fue descrita ya en 1868 por Charcot, aún continua desconociéndose su etiología y los tratamientos que se disponen no son curativos. Los estudios epidemiológicos han demostrado la existencia de un factor ambiental crítico para el desarrollo de la enfermedad, aún cuando éste permanezca desconocido. Además del factor ambiental existe un componente genético esencial que se conjuga con el factor ambiental para desencadenar el inicio de esta patología.

La existencia de factores genéticos de predisposición se ha confirmado en estudios familiares. Entre un 12% y un 19% de individuos con EM tienen familiares afectados, siendo más importante los de primer grado (Sadovnick y col., 1988). La mayor correlación se ha encontrado en gemelos monozigóticos (26%), mayor que la descrita en gemelos dizigóticos (2,3%) (McFarland y col., 1984). Los resultados procedentes de estos análisis indican que la enfermedad no está influenciada únicamente por factores genéticos, entre los que se han incluido los alelos del sistema HLA (del inglés *human leukocyte antigens* o MHC) y ciertos genes del receptor de células T (TCR, del inglés *T cell receptor*). De esta manera, determinados alelos HLA han sido asociados a la EM, como los alelos DR2 y DQw1. Esta asociación entre una patología con un componente autoinmune y un alelo HLA sugiere la existencia de células T restringidas por MHC implicadas en el proceso de la enfermedad. La asociación encontrada con ciertos alelos de la cadena  $\beta$  del TCR en determinadas enfermedades autoinmunes es un argumento que apoya la idea de que la EM sea una enfermedad mediada por células T (Wucherpfennig y col., 1991).

La EM muestra una mayor frecuencia en mujeres con una relación mujer/hombre de 1,4/1. Además existe un aumento de la prevalencia estrechamente relacionado con la distancia al Ecuador, tanto en el Hemisferio Norte como en el Hemisferio Sur, acercándose a

cero en el trópico, por lo menos para los individuos caucásicos, mientras que los individuos de origen africano y asiático suelen mostrar prevalencias bajas, independientemente de la latitud donde vivan. Sin embargo existen excepciones a esta regla general. Así, los estudios de Dean y Savettieri (Savettieri y col., 1986) en el sur de Italia han mostrado prevalencias similares a las encontradas en algunos países centroeuropeos situados en latitudes más altas. A la inversa, Kurtzke (1980) señala que a 40° de latitud norte las tasas de prevalencia de EM son altas en América, medias en Europa y bajas en Asia.

Según Kurtzke, la frecuencia de la EM estaría distribuida en bandas de distinta frecuencia o riesgo:

1. Una zona de alto riesgo, con prevalencias superiores a 30, comprendida entre los 43-65° de latitud norte en Europa, entre los 37-52° de latitud norte en Norteamérica y entre 34-44° de latitud sur para Australia y Nueva Zelanda.
2. Una zona de riesgo medio, con prevalencia entre 5-30°, que comprendería los países del sur de Europa, porción norte del Mediterráneo, extremo norte europeo, sur de los Estados Unidos y la zona meridional de Australia.
3. Una zona de bajo riesgo, con prevalencias inferiores a 5, que comprendería Asia, África, Oriente Medio y las regiones próximas al Ecuador.

Según esta teoría, habría una clara discontinuidad del riesgo de adquirir la enfermedad entre una zona y otra. Sin embargo, estudios homogéneos realizados en amplias zonas de EEUU, Australia y Nueva Zelanda parecen ir a favor de una progresión gradual de la enfermedad, más que de la existencia de zonas endémicas circunscritas.

A pesar de esta distribución geográfica, existen determinados grupos étnicos para los cuales, independientemente de donde residan, poseen una tasa de prevalencia baja, como es el caso de los japoneses. Para otros grupos étnicos, si bien se mantiene una menor prevalencia, sí muestran una tendencia a aumentar a medida que aumenta la latitud geográfica (similar al gradiente norte-sur en la población caucásica). Ello sugiere la actuación de algún factor ambiental que intervendría en el desencadenamiento de la enfermedad.

La tasa de prevalencia de la EM en personas procedentes de áreas de bajo riesgo que emigran a áreas de alto riesgo es más alta que la de su país de origen, pero inferior a la de los habitantes de la zona. A la inversa, parece haber disminución de la tasa de prevalencia de la EM de las personas procedentes de áreas de alto riesgo que emigran a áreas donde este es bajo, presentando prevalencias intermedias entre el país de origen y el de adopción. Sin embargo, parece existir una ventana temporal, ya que esta “adopción” del riesgo de la zona a la que se emigra sólo se produce cuando la emigración ocurre antes de los 16 años (Fernández y Fernández, 1998).

Estas observaciones llevaron a algunos autores (Alter, 1976; Alter y Cendrowsky, 1976) a proponer que el agente causante de la EM podría tratarse de uno o más virus, ino-  
cuo si es adquirido durante los primeros años de vida, pero que en personas predispuestas  
y adquirido durante la infancia tardía o adolescencia, podría conducir a la aparición de la  
enfermedad. La EM representaría pues una respuesta edad-dependiente a la infección.  
Así, se han asociado a la patogénesis de la EM al virus del sarampión, de la influenza, al-  
gunos miembros de la familia Herpesviridae (herpesvirus 6 y 7), diversos miembros de la  
familia Paramyxoviridae, coronavirus y retrovirus (Russell, 1997; Fernández-Muñoz y Cel-  
ma-Serrat, 2002; Moore y Wolfson, 2002).

De la misma manera que se desconocen los factores etiológicos que desencadenan  
la patología, los tratamientos disponibles no son efectivos y están orientados más hacia el  
tratamiento paliativo que hacia el curativo. El tratamiento de la EM se puede dividir en  
tres grandes apartados:

1. Tratamiento de la patogénesis: el fármaco más utilizado en la actualidad es el IFNB (Martín-Saavedra y col., 2007). Existen tres especialidades farmacéuticas distintas que reducen el número de brotes, la carga lesional y retrasan la progresión de la enfermedad (Jacobs y col., 2000; Comi y col., 2001). Otros medicamentos con efecto similar son el acetato de glatiramero (Johnson y col., 1998) y la mitoxantrona (Gonsette, 2004). Recien-  
temente ha sido aprobado por la FDA (*Federal Drug Administration*) el tratamiento con  
natalizumab (anticuerpo anti-VLA4) (Miller y col., 2003).
2. Tratamiento de los brotes: el fármaco más utilizado es la metil-prednisolona a altas  
dosis (1 g/24h). Los corticoides disminuyen la duración de los brotes (Beck y col., 1993;  
Tremlett y col., 1998). Asimismo, se ha observado pueden retrasar la progresión de la en-  
fermedad si son utilizados como tratamiento de base (Zivadinov y col., 2001).
3. Tratamiento de los síntomas: se orienta más bien a aliviar o mejorar los diversos  
síntomas o secuelas que se desarrollan a lo largo de la enfermedad. Entre los fármacos  
más usados están las benzodiacepinas, la toxina botulínica (Snow y col., 1990) y la rehabi-  
litación para tratar la espasticidad. La amantadina y los antidepresivos para tratar la fati-  
ga crónica. Para el tratamiento del dolor neuropático se utilizan la carbamacepina, gaba-  
pentina o los antidepresivos tricíclicos. La vejiga neurógena mejora con la oxibutinina, el  
betanecol y los sondajes intermitentes (Betts y col., 1993). Para la depresión sirven los  
antidepresivos tricíclicos o los inhibidores de la recaptación de la serotonina.

### 3.1 Infección con el virus de Theiler como modelo de esclerosis múltiple.

La inoculación intracraneal de cepas susceptibles de ratón con el virus de Theiler

(TMEV) induce una patología bifásica, consistente en una enfermedad temprana aguda, la cual ocurre entre los 3 y los 12 días post-infección, seguida de una etapa tardía crónico-desmielinizante que se desarrolla a los 30 ó 40 días post-infección y eventualmente causa la muerte de los animales (revisado por Oleszak y col., 2004).

La enfermedad temprana aguda se parece a la polioencefalomielitis y se asocia con la replicación viral en la sustancia gris del SNC ( $10^6$  y  $10^7$  ufp/g de tejido nervioso) y con la destrucción de neuronas a grados variables. Durante esta etapa, las cepas susceptibles exhiben un extenso infiltrado de células mononucleares en el SNC, principalmente de células T (ambos fenotipos CD4 y CD8), células de linaje monocítico/macrofágico, algunos linfocitos B y unas pocas células plasmáticas (Pope y col., 1996; Begolka y col., 1998; Murray y col., 1998). Aunque existe un infiltrado inflamatorio de las leptomeninges y de la corteza cerebral, la mayor cantidad de inflamación se concentra en la sustancia gris subcortical, en especial en regiones del diencefalo (tálamo, hipotálamo y subtálamo), el hipocampo (*stratum pyramidale*) y los ganglios basales (globo pálido y caudado-putamen). En la médula espinal, la inflamación se concentra predominantemente en las astas anteriores de la sustancia gris, aunque también está presente la inflamación en las leptomeninges. Estos infiltrados son preferentemente perivasculares, lo que lleva a que vasos de pequeño y mediano calibre sufran una vasculitis (Lindsley y Rodríguez, 1989). Esta etapa no es siempre clínicamente evidente y la severidad de la misma depende de la cepa y/o la dosis viral. Los títulos virales disminuyen marcadamente para el día 12 post-infección en los ratones susceptibles, pero estos no consiguen eliminar completamente al virus, el cual persiste en células macrofágico/microgliales, astrocitos y oligodendrocitos (Clatch y col., 1990; Jelachich y col., 1995) (Fig. 6).

A los 30 ó 40 días post-infección, las cepas murinas susceptibles infectadas comienzan a desarrollar una enfermedad tardía crónico-desmielinizante (TMEV-IDD) con extensas lesiones desmielinizantes en la sustancia blanca e infiltrado de células mononucleares en la médula espinal, que consiste principalmente de células T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, monocitos/macrófagos, algunos linfocitos T CD8<sup>+</sup> y células plasmáticas (Pope y col., 1996; Begolka y col., 1998; Murray y col., 1998). Histológicamente, la desmielinización está caracterizada por cambios vacuolares en la sustancia blanca, pérdida de mielina, tumefacción axonal (cuerpos esferoides) (McGavern y col., 2000). El proceso de desmielinización es multifocal e involucra a las columnas anteriores, posteriores y laterales, con preferencia de los segmentos torácicos. Esta etapa crónica lleva a una atrofia progresiva de la médula espinal y pérdida axonal con el correspondiente deterioro neurológico (disrupción de la coordinación motora, parálisis de las patas traseras, espasticidad, ataxia e incontinencia) (Drescher y col., 1997; McGavern y col., 2000). Existe una replicación viral de bajo grado,

a niveles de  $10^1$ - $10^3$  pfu/g de tejido nervioso, en macrófagos/microglia, oligodendrocitos y astrocitos en sustancia blanca de las médulas espinales de ratones infectados con TMEV (Lipton y Jelachich, 1997). Esta persistencia viral es un prerrequisito para el desarrollo de la etapa crónico-desmielinizante.

Es esta última etapa, la crónico-desmielinizante, la que se utiliza como modelo animal de EM, en particular de la variedad primaria progresiva (EMPP).

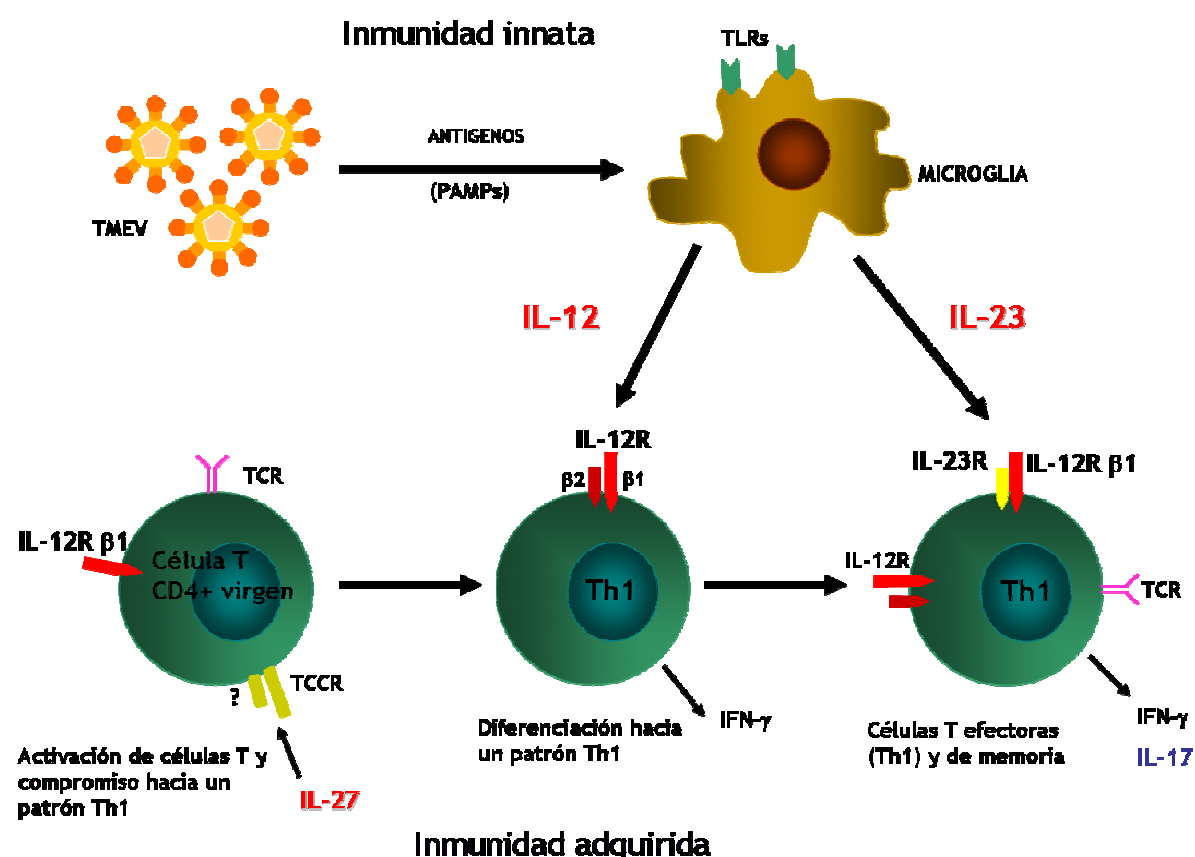


Figura 6: Esquema de la relación entre la infección viral con TMEV, las citoquinas heterodiméricas y la activación linfocitaria.

### 3.2 Neuropatología comparativa entre la TMEV-IDD y la EM.

- **Desmielinización inflamatoria:** tanto las células T CD4<sup>+</sup> como CD8<sup>+</sup> y los macrófagos que infiltran el SNC en ratones infectados con TMEV contribuyen a la desmielinización. La respuesta autoinmune contra los antígenos de mielina generados durante el fenómeno de expansión de epítomos jugaría también un papel importante en la propagación de la enfermedad. Factores tóxicos, inmunológicos y metabólicos adicionales (complemento, óxido nítrico, productos de la ciclooxygenasa, estrés oxidativo, daño excitotóxico) atacan a las vainas de mielina, a los oligodendrocitos y/o a los axones, contribuyendo a la desmie-

linización inducida por TMEV. El patrón de daño oligodendroglial, similar al encontrado en EM (Itoyama y col., 1980; Ludwin y Johnson, 1981), es una forma de degeneración retrógrada que comienza a los procesos celulares más distales de los oligodendrocitos cercanos a los axones en ratones infectados con TMEV (Ludwin y Jonson, 1981; McGavern y col., 1999).

- **Remielinización:** varios grados de remielinización están presentes en las lesiones desmielinizantes inducidas por TMEV (McGavern y col., 1999), aunque sus mecanismos no se conocen con claridad.
- **Daño axonal:** durante la fase crónica avanzada de la enfermedad desmielinizante existe un incremento marcado de la atrofia del parénquima de la médula espinal con un concomitante aumento de la desmielinización (McGavern y col., 2000). No está claro si el daño axonal durante la infección con TMEV resulta de una injuria directa (inflamatoria) o de una degeneración de tipo Walleriana, lo que explicaría la pérdida axonal tardía (McGavern y col., 2000). En contraste, Tsunoda y Fujinami (2002) han propuesto que en este modelo, el daño axonal acompañado por la apoptosis de los oligodendrocitos precede a la desmielinización y sugieren que es el daño axonal quien dispara la desmielinización.
- **Citoquinas:** son mediadores solubles responsables del inicio y mantenimiento de la respuesta inmunológica. Son producidas por células del sistema inmune fundamentalmente, como linfocitos T y células de estirpe mieloide así como la microglía activada. En el SNC se ha descrito que también los astrocitos (Aloisi y col., 1992; Farina y col., 2007) e incluso las neuronas son capaces de producir citoquinas. Las citoquinas producidas tanto en EM como en TMEV-IDD incluyen tanto las de carácter proinflamatorio, como TNF $\alpha$ , IFN $\alpha$ , IFN $\beta$ , IFN $\gamma$  (Traugott y Lebon, 1988) e IL-1, IL-2 (Cannella y Raine, 1995); como de carácter antiinflamatorio, como IL-4, IL-10 (Hulshof y col., 2002) o TGF $\beta$  (De Groot y col., 1999). De la misma manera, en animales infectados con TMEV se han encontrado aumentos en los niveles de los transcritos de TNF $\alpha$ , IFN $\gamma$ , IL-12, IL-4 e IL-10 (Sato y col., 1997; Begolka y col., 1998).
- **Óxido nítrico (NO):** es una molécula altamente reactiva implicada en procesos tanto fisiológicos como patológicos, como la neurotransmisión, señalización intracelular, el mantenimiento del tono vascular o la defensa frente a microorganismos. Se sintetiza a partir de la L-arginina y está catalizada por la enzima óxido nítrico sintasa (NOS, del inglés *nitric oxide synthase*), de la cual existen tres isoformas: neuronal (nNOS), endotelial (eNOS) e inducible (iNOS o NOS-2). En situaciones de inflamación, dentro del SNC, distintos tipos celulares pueden expresar iNOS, como microglía, macrófagos perivasculares, astrocitos (Hewett y col., 1993; Molina-Holgado y col., 1997), oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2001) y hasta el endotelio. Existen ciertas analogías entre el patrón de

expresión de iNOS en EM y TMEV-IDD. Durante la fase aguda (6-10 días post-infección) y el inicio de la fase crónica (39-42 días post-infección) de TMEV-IDD, se observa un incremento importante de la expresión de NO en el SNC, que tiende a desaparecer conforme la enfermedad se cronifica. Asimismo los astrocitos y monocitos de lesiones activas de pacientes con EM presentan altos niveles de NO, lo cual no se observa en lesiones crónicas (Oleszak y col., 1997). Estas observaciones sugieren que NO actúa principalmente en las primeras etapas de la patología participando activamente en el proceso desmielinizante.

- **Ciclooxigenasa-2 (COX-2):** es la enzima clave en la síntesis de metabolitos derivados del ácido araquidónico. Esta gran familia de compuestos incluyen prostaglandinas, prostaciclina y tromboxanos. La inducción de la isoforma COX-2 tiene lugar en respuesta a factores de crecimiento, moléculas proinflamatorias y citoquinas (Caughey y col., 2001; Moolwaney e Igwe, 2005; Wu y col., 2006), lo que le permite participar en situaciones de inflamación, inmunomodulación, flujo sanguíneo, apoptosis y fiebre (Dubois y col., 1998; Cao y col., 2001). Otra vez existen correlaciones en la expresión de COX-2 entre pacientes con EM y ratones con TMEV-IDD. Así, se detecta la expresión de COX-2 en macrófagos, microglía y células endoteliales de pacientes con EM (Minghetti, 2004; Rose y col., 2004). De igual manera se detecta COX-2 en oligodendrocitos apoptóticos (Carlson y col., 2006), microglía/macrófagos activados y células endoteliales (Mestre y col., 2006).

### 3.3 Cannabinoides y EM.

Las primeras evidencias acerca del consumo de cannabis (*Cannabis sativa*) datan del año 4000 a.c. en China. Sus propiedades han sido recogidas en la primera farmacopea china, *Pên-ts'ao Ching*, escrita bajo el reinado del emperador Huang Ti, donde se recomienda su uso para tratar patologías como la malaria, el dolor reumático, el beri-beri o las alteraciones menstruales. Asimismo se recogían los síntomas debido al exceso de ingesta, el cual podía generar “visiones diabólicas”.

A partir de allí, su consumo con fines ritualísticos, recreativos o terapéuticos se ha expandido por todo el mundo. Se encuentran evidencias de su cultivo y consumo en la India, donde se recogen sus propiedades “divinas” en el texto sagrado *Atharva Veda* (Touw, 1981). El contacto del mundo árabe medieval con las regiones de la India y China donde estaba establecido el uso del cannabis permitió la difusión del mismo por todo el Oriente Medio y su expansión por África y Europa, en particular por su asociación con la secta esotérica Sufí de los derviches giróvagos (Zias y col., 1993). Cabe destacar que la mayor parte del cannabis que se consume en Europa proviene en la actualidad del área del Rif marroquí, donde la droga recibe el nombre de *kif* (Merzouki y Mesa, 2002). La antigua Grecia

también recoge evidencias del uso de cannabis, más allá del hecho de que se cultivara para obtener la fibra del cáñamo. Los médicos de la antigüedad clásica Dioscórides y Galeno mencionan el uso del cannabis en medicina y existen indicios de su uso como embriagante en los rituales y eventos religiosos del mundo clásico (Brunner, 1973). En todos los casos se encuentran evidencias del consumo de marihuana con fines terapéuticos muy diversos como: calmante del dolor, de las convulsiones infantiles, migrañas, histeria, artritis, neuralgia, ciática o tétanos; también como antifebril, inductor del apetito, como tónico general para aliviar la fatiga, diurético, como para disminuir la hinchazón testicular e incluso como afrodisíaco (revisado por Ramos, 2002).

A pesar del uso extendido del cannabis como medicina durante gran parte del siglo XIX (tanto que el médico particular de la Reina Victoria del Reino Unido, Sir John Russell Reynolds, llegó a proponerlo como agente terapéutico), el progreso en el conocimiento de la farmacología del cannabis fue muy limitado. Acompañando este uso terapéutico, ha existido siempre un uso recreativo de la marihuana en sus diversas formas debido a sus efectos psicotrópicos, los cuales condujeron eventualmente a la prohibición de su consumo en los Estados Unidos en los años cincuenta. Esta prohibición repercutió negativamente en la investigación, dentro de este país, de las propiedades medicinales del cannabis y de sus mecanismos de acción. Hubo que esperar varios años y superar varios prejuicios hasta que se volviera a prestar atención a los efectos que producen los cannabinoides en el organismo y se estudiara su potencial uso terapéutico en diversas patologías.

El aislamiento del principal componente activo de la marihuana, el (-)- $\Delta^9$ -tetrahidrocannabinol (THC) en 1965 por el grupo de Mechoulam y Gaoni, junto con el clonado y caracterización de receptores específicos para cannabinoides (Devane y col., 1988), así como los principales ligandos endógenos, como la anandamida (AEA) (Devane y col., 1992) y el 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam y col., 1995) han impulsado exponencialmente el estudio de derivados de la marihuana con fines terapéuticos en los últimos años. Estos eventos condujeron a un mayor interés por parte de la comunidad científica y médica por los potenciales usos terapéuticos del cannabis y de los cannabinoides. Así, en 1997 tanto el *National Institute of Health* (Estados Unidos) como el *British Medical Association* (Reino Unido) emitieron informes favorables para el uso de estos compuestos con fines medicinales. Estas posibilidades terapéuticas hacen referencia a trastornos como el asma, náuseas y vómitos, dolor crónico (Ware y col., 2002), EM y otras enfermedades neurodegenerativas, pérdida de apetito y caquexia en pacientes con cáncer (Noyes y col., 1975) o SIDA (Fogarty y col., 2007), glaucoma o alteraciones nerviosas como epilepsia, insomnio, ansiedad y depresión (Robson, 2001).

En relación a la EM, el hecho de que la proporción de consumidores de cannabis sea



superior en el grupo de personas que padecen esta enfermedad a la de la población sana, aunado al hecho que estos pacientes refieren un alivio en la sintomatología de dicha enfermedad (Clifford, 1983; Meinck y col., 1989; Maurer y col., 1990), ha despertado el interés de la comunidad médica y científica por evaluar el potencial uso terapéutico del cannabis y sus derivados en los distintos signos y síntomas de la EM, así como de los mecanismos de acción por lo cuales estos compuestos podrían estar actuando. Apoyando estas observaciones, un estudio canadiense estima que en este país un 15% de los pacientes que padecen esta enfermedad utilizan cannabis para aliviar sus síntomas (Clark y col., 2004). Estas personas referían que el uso de cannabis aliviaba síntomas como la rigidez muscular, los espasmos y el dolor (Page y col., 2003; Clark y col., 2004). Un estudio similar, a menor escala, señala que los pacientes de EM que consumen cannabis declaran percibir mejorías en algunos síntomas de la enfermedad, como la espasticidad, el dolor crónico en las extremidades, disfunción emocional, estados de fatiga, doble visión y visión borrosa, disfunciones sexuales, intestinales y vesicales, alteraciones en la marcha y pérdida de la memoria (Consroe y col., 1997). Estas observaciones llevaron a que en el año 2003 se realizara un estudio aleatorizado a gran escala con pacientes de EM, a los cuales se les administró oralmente una dosis de THC durante quince días. De acuerdo a este estudio, denominado CAMS (del inglés *Cannabinoids in Multiple Sclerosis*), a pesar de que no existe una mejora significativa en la gravedad de los síntomas de la enfermedad, el tratamiento con THC podría resultar terapéuticamente relevante en términos de alivio de la nocicepción y facilitación del inicio del movimiento, en particular de la marcha (Zajicek y col., 2003). Además, en un estudio a más largo plazo con la misma población de pacientes, se demostraron cambios en la sintomatología motora. Sin embargo, una de las principales críticas a este estudio se refiere a la necesidad de realizar una evaluación riesgo/beneficio de este tratamiento, ya que el uso prolongado del THC podría repercutir negativamente sobre la función cognitiva del paciente (Iversen, 2005).

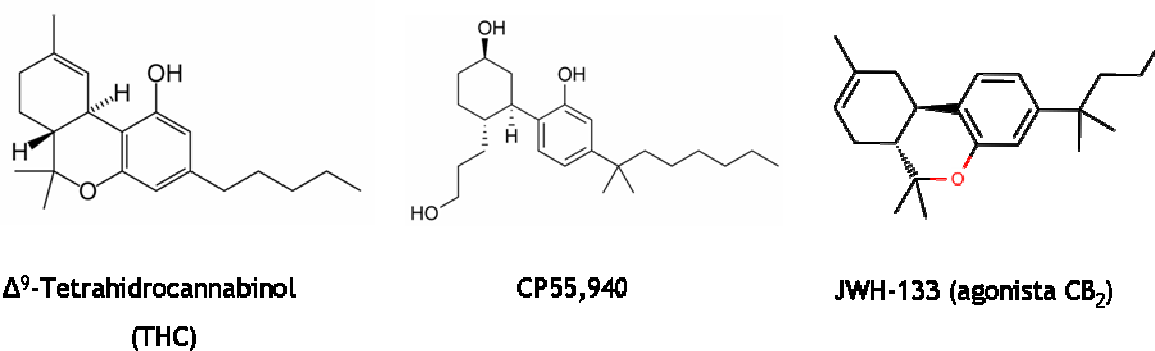
Una vez establecido que el cannabis y, por extensión, los compuestos cannabinomiméticos podrían ser de utilidad terapéutica en patologías como la EM, es de suma importancia establecer el papel del sistema cannabinoide endógeno en esta enfermedad, así como los beneficios que pudiera presentar la manipulación farmacológica del mismo.

#### **4. Sistema cannabinoide endógeno.**

Durante mucho tiempo las propiedades altamente lipofílicas del THC y otros análogos dificultaron la obtención de resultados inequívocos que permitieran determinar los mecanismos de acción de estos compuestos, a los que se denominó genéricamente como

cannabinoides. De hecho, se les atribuía un mecanismo de acción inespecífico, considerando a sus efectos como el producto de una mera alteración de las membranas celulares (revisado por Mechoulam y Hanus, 2000).

A medida que se fueron refinando las metodologías de estudio de estos compuestos se empezó a cuestionar el mecanismo de acción propuesto para los cannabinoides. Así, se describieron diferencias de actividad entre sustratos estructuralmente muy parecidos e incluso entre estereoisómeros. La hipótesis de que estas sustancias actuaban sobre un sitio de unión específico fue cobrando cada vez mayor fuerza (Mechoulam y col.; 1990; Howlett y col., 1990). En 1988, Howlett y col. proveyeron la primer evidencia de un sitio de unión específico de cannabinoides en sinaptosomas de cerebro de rata usando el compuesto [ $^3\text{H}$ ]CP55,940 como ligando (Fig. 7).



**Figura 7: Estructura de algunos cannabinoides exógenos.** El  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol (THC) es el principal componente psicoactivo de la planta *Cannabis sativa*. El compuesto CP55,940 es un agonista cannabinoide 45 veces más potente que THC. El compuesto JWH-133 es un agonista específico del receptor CB<sub>2</sub>.

#### 4.1 Receptores.

En 1990, Matsuda y col. anunciaron el clonado de un ADNc que codificaba para el receptor cannabinoide CB<sub>1</sub> a partir de una biblioteca génica de cerebro de rata. Este receptor CB<sub>1</sub> pertenece a la superfamilia de receptores de siete pasos transmembrana acoplados a proteína G inhibitoria (G<sub>i</sub>/G<sub>o</sub>) y que tiene una alta homología con el de humano (98% a nivel de aminoácidos). Este receptor se distribuye principalmente en estructuras del SNC, localizándose principalmente en cerebro, en ganglios basales, hipocampus y capa molecular del cerebelo (Herkenham y col., 1990; Herkenham y col., 1991; Mailleux y Vanderhaeghen, 1992; Tsou y col., 1998), lo que explica los efectos sobre la coordinación motora, procesos cognitivos y memoria. Sin embargo, también se ha descrito presencia del receptor CB<sub>1</sub> en tejidos periféricos como bazo, amígdalas, corazón, próstata, útero y ovario.

Unos años después, el grupo de Munro y col. (1993) clonó otro ADNc que codificaba

al receptor cannabinoide CB<sub>2</sub> a partir de una biblioteca génica de la línea celular de leucemia promielocítica HL-60. El receptor CB<sub>2</sub> pertenece a la misma familia de receptores acoplados a proteína G inhibitoria (G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub>), y está constituido por 360 aminoácidos tanto en el humano como en la rata. Ambos receptores cannabinoideos exhiben un 44% de homología (68% si se consideran únicamente los dominios transmembrana). Al estar acoplados G<sub>i</sub>/G<sub>0</sub> inhiben la producción de AMPc, efecto que se ve contrarrestado al tratar las células o el tejido con toxina pertusis. Este receptor se localiza fundamentalmente en células del sistema inmune (linfocitos B, linfocitos T, monocitos, polimorfonucleares, mastocitos y células NK), bazo y amígdala (Galiege y col., 1995; Pertwee, 1997; Schatz y col., 1997), lo cual explicaría que su activación tuviese efectos antiinflamatorios (Klein, 2005).

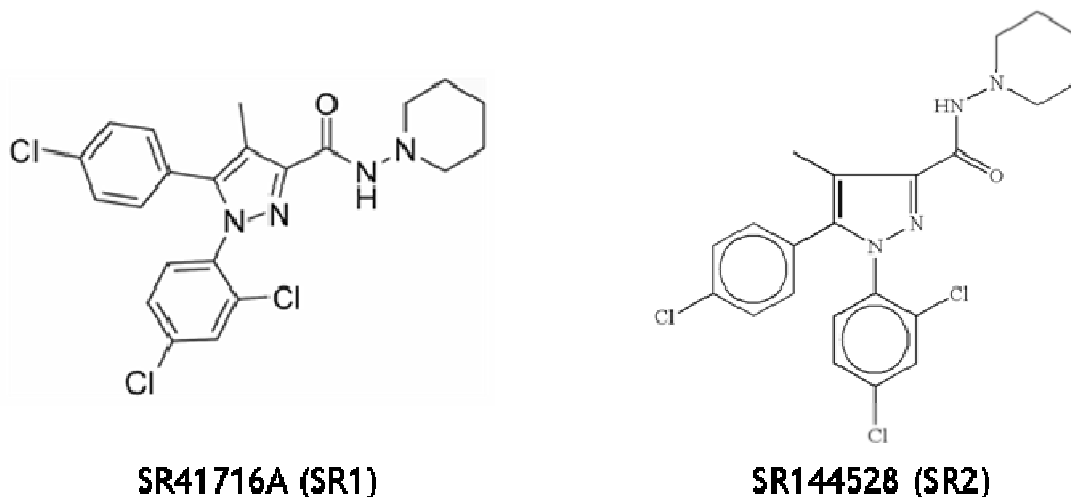
En los últimos años se ha sugerido la presencia del receptor CB<sub>2</sub> en el sistema nervioso. Actualmente, mediante técnicas de RT-PCR se ha observado la expresión de transcritos de CB<sub>2</sub> en cerebro (corteza, tronco cerebral y cerebelo), aunque con niveles muy bajos (van Sickle y col., 2005; Onaivi y col., 2006). A nivel celular se ha observado la expresión del ARNm de CB<sub>2</sub> en neuronas del cerebelo y se ha descrito inmunorreactividad para este receptor en neuronas y procesos gliales en hipocampo, en neuronas de Purkinje (Ashton y col., 2007), así como en microglía (Cabral y Marciano-Cabral, 2005) u oligodendrocitos *in vitro* (Molina-Holgado y col., 2002b). La presencia del receptor CB<sub>2</sub> en astrocitos sigue siendo controvertida, aunque se ha descrito que agonistas específicos para este receptor son capaces de generar efectos celulares (Docagne y col., 2007) y se ha observado su expresión en astrocitos reactivos en tejido *post-mortem* de pacientes con EM (Benito y col., 2007).

El papel de CB<sub>2</sub> en el SNC no se conoce con precisión, sin embargo trabajos recientes con hurones sugieren que participan en el efecto antiemético del endocannabinoide 2-AG. Esto se debe, al menos en parte, a la activación de los receptores CB<sub>2</sub> presentes en el tronco cerebral (van Sickle y col., 2005).

Recientemente, por evidencias farmacológicas, se ha sugerido la existencia de otros receptores cannabinoideos de los que está pendiente su caracterización molecular. En los trabajos de Calignano y col. (1998) se describe la existencia de un receptor cannabinoide no CB<sub>1</sub> y no CB<sub>2</sub> sensible a SR144528. Por su parte, el grupo de Kunos sugirió en 1999 la existencia de un receptor cannabinoide específico de endotelio (Jarai y col., 1999, Offerthaler y col., 2003). Además, Breivogel y col. (2001) sugirieron la existencia de un receptor específico para AEA y WIN-55,212-2 en cerebro de ratón (revisado por Howlett, 2002).

Dentro de los antagonistas específicos para receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> clásicos, SR141716A (SR1, K<sub>i</sub>=5,6nM frente a una K<sub>i</sub>>1000nM para CB<sub>2</sub>) y SR144528 (SR2, K<sub>i</sub>=0,6nM frente a una K<sub>i</sub>=437nM para CB<sub>1</sub>), respectivamente, fueron desarrollado por la empresa farmacéutica

Sanofi en la década de los 90. Sin embargo, se han desarrollado nuevos compuestos antagonistas que también pueden actuar como agonistas inversos, como por ejemplo AM251 o AM281 (antagonistas CB<sub>1</sub>) (Lan y col., 1999) o AM630, antagonista del receptor CB<sub>2</sub> (Pertwee y col., 1995) (Fig.8).



**Figura 8:** Estructura química de los antagonistas de receptores cannabinoides. SR41716A es el antagonista del receptor CB<sub>1</sub> y SR144528 es el antagonista del receptor CB<sub>2</sub>.

## 4.2 Ligandos.

El hecho de que existieran en distintos tejidos sitios de unión específicos (receptores) a compuestos cannabinomiméticos exógenos sugirió inmediatamente la existencia de cannabinoides endógenos, al igual que ocurre con el sistema opioide. En 1992, Devane y col. aislaron de cerebro de cerdos un compuesto lipídico, cuya estructura química correspondía a la *N*-araquidonoiletanolamida y al que estos investigadores bautizaron como “anandamida” (AEA). Este grupo demostró que este compuesto se unía con alta afinidad al receptor CB<sub>1</sub> ( $K_i=52\text{nM}$ ), que provocaba una reducción en la actividad motora espontánea, inmovilidad, hipotermia y analgesia cuando era inyectada a ratones (Devane y col., 1992). Otros grupos mostraron que la AEA producía la inhibición de canales de  $\text{Ca}^{2+}$  voltaje dependientes, la activación de la corriente rectificadora de potasio, la estimulación de la unión de [ $^{35}\text{S}$ ]GTP $\gamma$ S a proteínas G, la activación de las MAP quinasas, la inhibición de la liberación de neurotransmisores, alteraciones en la memoria, la inhibición de la potenciación a largo plazo (LTP, del inglés *long-term potentials*) en rodajas de hipocampo, la inhibición de la nocicepción, vasodilatación, bradicardia y la inhibición de la inducción de la sintasa del óxido nítrico entre otros efectos (Di Marzo, 1998; Piomelli y col.,

1998; Sugiura y col., 2002). En varios de los casos arriba citados, la AEA se comporta como un agonista parcial.

Recientemente se han descrito nuevos mecanismos de acción para la AEA: ésta es capaz de unirse al receptor de vanilloides VR1 (inicialmente identificado como sitio de unión específico de la capsaicina, molécula responsable de la sensación irritante característica de los alimentos “picantes”) (Caterina y col., 1999; Hayes y col., 2000; Ralevic y col., 2001). El receptor VR1 pertenece a la familia de receptores del tipo canal iónico y está asociado a la transducción de señales en la vía nociceptiva. Otros grupos han propuesto que AEA actuaría uniéndose a microdominios de la membrana citoplasmática ricos en colesterol y esfingolípidos, denominados balsas lipídicas (del inglés *lipid rafts*) o a caveolas (complejos *caveolae*). Ambos tipos de dominios están enriquecidos en moléculas implicadas en la transducción de señales, tales como receptores acoplados a proteína G, tirosina quinasas pertenecientes a la familia de la proteína Src y la isoforma endotelial de la sintasa del óxido nítrico (eNOS). En este contexto, se han descrito recientemente efectos de AEA sobre algunos procesos celulares que involucrarían a estas balsas lipídicas, en particular el proceso de apoptosis en determinadas líneas celulares (Biswas y col., 2003). Últimamente se ha empezado a prestar atención a los derivados de la AEA vía metabolismo de ésta por la enzima Ciclooxygenasa tipo 2 (COX-2), lo cual explicaría una serie de efectos de este eicosanoide que se han reportado como independientes de receptores cannabinoides, receptores vanilloides o de balsas lipídicas (Ross y col., 2002; Rockwell y Kaminski, 2004). Al ser AEA una amida del ácido araquidónico, este compuesto puede ser sustrato de la COX-2, no así de la COX-1, para dar origen a una familia de compuestos relacionados con las prostaglandinas y que han pasado a denominarse prostamidas (Yu y col., 1997). En particular, el metabolito prostamida E2 (prostaglandin E2 etanolamida) parece ser el más potente en cuanto a su capacidad de interaccionar con los receptores de prostaglandina E2 (receptores EPs), aunque actúa como un agonista parcial de los mismos. Tampoco se descarta la existencia de receptores propios de prostamidas (Ross y col., 2002).

Otra molécula identificada como un cannabinoide endógeno fue el ácido 2-araquidonoilglicerol (2-AG) (Mechoulam y col., 1995; Sugiura y col., 1995). Este compuesto es un monoacilglicerol con un residuo araquidónico esterificado en posición 2 de la cadena glicerol. El 2-AG es un agonista de los receptores cannabinoides con efectos similares a la AEA, aunque menos potentes (Di Marzo y col., 1998; Piomelli y col., 1998; Sugiura y col., 2000; 2002). En el cerebro, su biosíntesis está regulada de manera independiente a la de AEA (Stella y Piomelli, 2001) y su concentración es elevada. El 2-AG es producido por microglía y astrocitos en respuesta a la estimulación del receptor purinérgico P2X7

(Carrier y col., 2004; Witting y col., 2004), el cual asocia directamente el daño neuronal con la liberación de endocannabinoides. En cultivos primarios de microglía, el 2-AG induce migración celular, efecto mediado por el receptor CB<sub>1</sub>, ya que es revertido por el antagonismo con SR1 (Walter y col., 2003). Posiblemente en situaciones de neuroinflamación, las neuronas y astrocitos produzcan 2-AG como una manera de reclutar microglía (Walter y col., 2003).

Recientemente ha habido un incremento en la identificación de nuevos agentes cannabinomiméticos, a los cuales cabría añadir los compuestos vanilloides debido a la interrelación de ambos sistemas. Los posibles nuevos agonistas de receptores cannabinoides son: 2-araquidoil-gliceril-éter (noladin-éter, 2-AGE), *O*-araquidonoil-etanolamida (virhodamina), *N*-palmitoiletanolamina (N-PIA) y *N*-araquidonoil-dopamina (NADA) (Bisogno y col., 2000; Burstein y col., 2002; Porter y col., 2002) (Fig. 9).

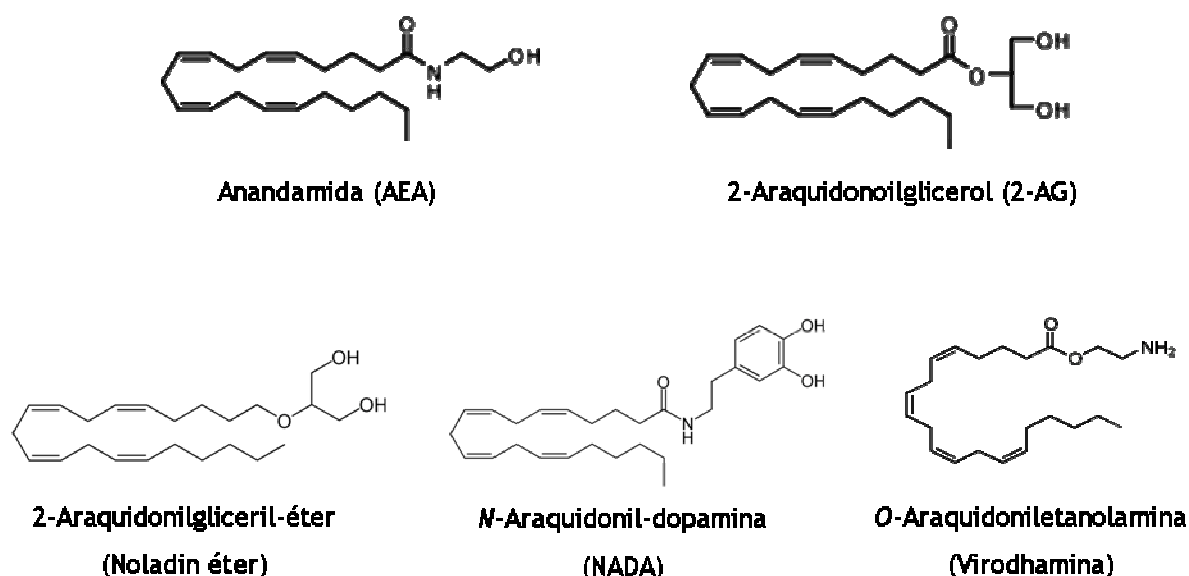


Figura 9: Estructura molecular de los principales endocannabinoides.

#### 4.3 Biosíntesis y degradación de los endocannabinoides.

En general, los niveles basales de estos endocannabinoides son bajos (del orden de pmol/mg de tejido) y son en su mayoría sintetizados *de novo* frente determinados estímulos (Hansen y col., 2000; Ueda y col., 2001). Existen distintas transacilasas y fosfolipasas inespecíficas que participan en la biosíntesis de estos compuestos lipídicos. En la biosíntesis de AEA están involucradas las mismas enzimas que participan en la síntesis de las *N*-aciletanolaminas. Los estudios del grupo de Schmid (revisado por Schmid y Berdyshev, 2002) han demostrado que estos compuestos son sintetizados vía un mecanismo dependiente de fosfolípidos, que provienen de la hidrólisis enzimática de las *N*-acil-

fosfatidiletanolaminas (NAPEs, del inglés *N-acyl-phosphatidylethanolamines*). La enzima que cataliza esta reacción es la fosfolipasa D (PLD, del inglés *phospholipase D*) selectiva para las NAPEs (NAPE-PLD) con baja afinidad para otros fosfolípidos de membrana. A su vez, las NAPEs son producidos mediante la transferencia de grupos acilos desde la posición *sn*-1 de los fosfolípidos a la posición *N*- de las fosfatidiletanolaminas (PE, del inglés *phosphatidylethanolamines*), catalizada por una transacilasa dependiente de  $\text{Ca}^{2+}$ . Ni la PLD ni las transacilasas parecen exhibir ningún tipo de selectividad por ningún motivo de ácido graso en particular. Esta ruta de biosíntesis ha sido descrita en tejido cerebral, testículos y leucocitos murinos, donde se ha detectado la *N*-araquidonoil-fosfatidiletanolamina (NArPE), la NAPE precursora de AEA (Berrendero y col., 1999; Bisogno y col., 1999). En cuanto a la biosíntesis del 2-AG, esta molécula se produce por la hidrólisis de diacilglicerolos (DAGs) que contienen el motivo 2-araquidonato, reacción catalizada por una DAG lipasa *sn*-1 selectiva (*sn*-1 DAGL). A su vez, los DAGs precursores del 2-AG pueden ser producidos por la hidrólisis de 2-araquidonatos que contengan ácido fosfatídico (PA); catalizada por una PA fosfohidrolasa; o a partir de fosfoinosítidos (PI), catalizada por una fosfolipasa C selectiva de PI (PI-PLC). Hasta la fecha se han clonado y caracterizado dos isoenzimas de la *sn*-1 DAGL (Bisogno y col., 2003) las cuales se ubican en la membrana plasmática y son dependientes de  $\text{Ca}^{2+}$ . Las vías biosintéticas del noladín-éter, virhodamina y NADA son menos conocidas y están peor caracterizadas, pero parecerían estar involucradas además mecanismos no mediados por fosfolípidos y vías independientes de  $\text{Ca}^{2+}$  (revisado por De Petrocellis y col., 2004; Lambert y Fowler, 2005).

El primer paso en la inactivación de los endocannabinoides consiste en su rápida recaptura ( $t_{1/2} \leq 5$  min.) desde el espacio extracelular hacia el citoplasma. Dada su naturaleza lipofílica, los endocannabinoides pueden atravesar la membrana celular si su concentración extracelular es superior a la intracelular. Sin embargo, para ser eficaz, este proceso debe ser controlado por mecanismos selectivos, ya sea mediante un transportador de membrana o bien mediante la rápida degradación de estos compuestos una vez dentro del citoplasma celular. Tanto AEA como 2-AG son recaptados por un mecanismo de “transporte facilitado”, selectivo, saturable, dependiente de la temperatura y de  $\text{Na}^+$ , denominado como “transportador de membrana de anandamida” (AMT, del inglés *anandamide membrane transporter(s)*) (Di Marzo y col., 1994; Beltramo y col., 1997; Bisogno y col., 1997; Hillard y col., 1997; Maccarrone y col., 1998; revisado por Fowler y Jacobsson, 2002). Aún cuando este mecanismo haya sido descrito por varios grupos y se hayan desarrollado compuestos que inhiben selectivamente a este transportador de AEA (De Petrocellis y col., 2000; López-Rodríguez y col., 2001; Ortas y col., 2003), hasta la fecha no ha sido clonada ninguna proteína que pudiera ser la responsable de este proceso de recaptu-

ra. Este hecho ha llevado a varios investigadores a dudar de la existencia de dicho transportador, proponiendo otros mecanismos que facilitarían la difusión de los endocannabinoides hacia el citoplasma celular mediante el establecimiento de un gradiente de concentración por parte de hidrolasas específicas degradarían rápidamente a estos compuestos (Glaser y col., 2003). Existen, sin embargo, numerosas evidencias farmacológicas, aunque indirectas, que apoyan la existencia del AMT (revisado por Hillard y Jarrahain, 2003): (1) varios tipos celulares recapturan rápidamente AEA desde el medio extracelular aún cuando no expresan la principal enzima de degradación de AEA; (2) se han desarrollado varios compuestos que inhiben selectivamente la recaptura sin actuar sobre la enzima de degradación; (3) Noladín-éter y NADA, dos compuestos que son refractarios a la degradación enzimática, son recaptados por las células mediante un mecanismo dependiente de la temperatura y esta recaptura es inhibida competitivamente por AEA (Fezza y col., 2002); (4) los compuestos que inhiben al AMT “potencian” los efectos extracelulares de AEA (es decir, aquellos mediados por el receptor CB<sub>1</sub>, por ejemplo) mientras que “inhiben” a los efectos mediados por dianas intracelulares (los receptores VR1, por ejemplo) (De Petrocellis y col., 2001) y (5) el LPS inhibe la expresión de la enzima de degradación de AEA sin afectar la recaptura de dicho endocannabinoides (Maccarrone y col., 2001), mientras que el tratamiento agudo o crónico con etanol inhibe este proceso sin afectar la expresión de la enzima de degradación ni su actividad (Basavarajappa y col., 2003). Estos datos sugieren que, aunque la hidrólisis intracelular influye en gran medida la tasa de difusión facilitada de AEA, el mecanismo de recaptura estaría mediado por un proceso distinto de la degradación hidrolítica de AEA.

En la vía catabólica, la enzima más importante por su concentración y actividad metabólica, es la amidasa de ácidos grasos de cadena larga (FAAH, del inglés *fatty acid amide hydrolase*) identificada por primera vez por el grupo de Cravatt en 1996. Esta enzima cataliza la degradación de AEA y de 2-AG en ácido araquidónico y etanolamina o glicerol, respectivamente. FAAH posee un pH óptimo alcalino y se ubica en las membranas microsomas. Ratones *knock out* para FAAH muestran elevados niveles de AEA en el cerebro al mismo tiempo que una menor sensibilidad frente a determinados estímulos nociceptivos. Sin embargo, los niveles de 2-AG en estos ratones se encontraba en rangos normales, lo que indica la existencia de otra(s) enzima(s) conocida(s) como monoacilglicerol lipasa(s) (MAGLs) (Di Marzo y col., 1999; Goparaju y col., 1999; Lichtman y col., 2002). Esta(s) enzima(s), perteneciente(s) al grupo de las monoacilglicerol lipasas (MAGLs, del inglés *monoacylglycerol lipases*) se encuentran tanto en las membranas como en el citosol celular y también reconocen a otros monoacilglicerol insaturados, como por ejemplo el monooleoil-glicerol, el cual actúa como inhibidor competitivo de la inactivación de 2-AG en



células intactas (Ben-Shabat y col., 1998). Recientemente se ha descrito una nueva MAGL, expresada principalmente por la microglía y que regularía los niveles de 2-AG en este tipo celular (Muccioli y col., 2007).

Otros mecanismos posibles de inactivación de los endocannabinoides, en particular para aquellos que son resistentes a la degradación vía FAAH como la virhodamina, la NADA o el noladín-éter, consisten en la esterificación de (fosfo)glicéridos mediante acilasas y/o fosforilasas (Di Marzo y col., 1998; 1999; Fezza y col., 2002) u oxidación enzimática del motivo araquidonoil por lipoxigenasas, ciclooxygenasa-2 y citocromo p450 (Kozak y Marnett, 2002). La oxidación de AEA por la COX-2 representa una vía particularmente importante ya que da origen a prostaglandin-etanolamidas (prostamidas), compuestos con elevada potencia en algunos ensayos, aún cuando carecen de actividad cannabinomimética o sobre receptores prostanoideos (Woodward y col., 2001; Ross y col., 2002) (Fig. 10).

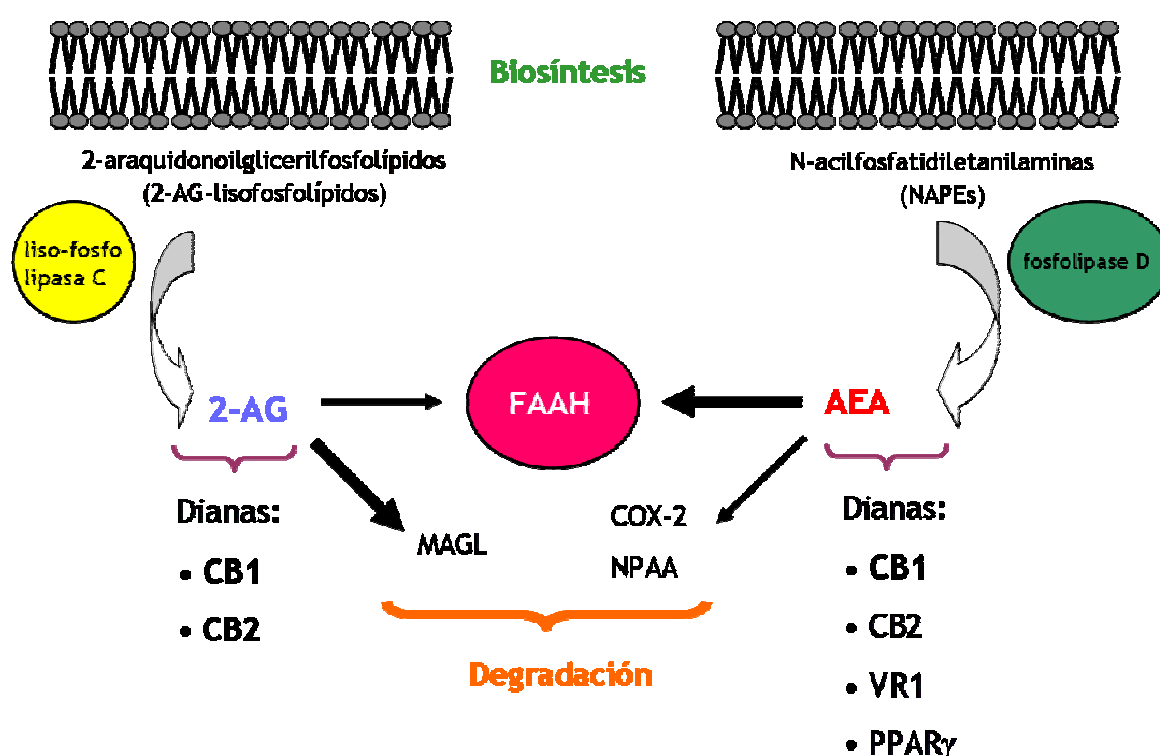


Figura 10: Esquema de las principales vías de biosíntesis y degradación de los endocannabinoides más importantes, así como de sus principales dianas de acción.

#### 4.4 Mecanismos de transducción de señal de los receptores cannabinoides.

Aún antes de clonarse los receptores cannabinoides, ya se había descrito que estos compuestos inhibían la adenilato ciclasa (Howlett y Fleming, 1984) por un mecanismo sensible a la toxina pertusis, lo que sugería que los cannabinoides podrían actuar por medio de proteínas  $G_{i/o}$  (Howlett, 1985). Posteriormente, se ha podido comprobar que, en

efecto, la activación de los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> acoplados a proteínas G<sub>i/o</sub>, resulta en la inhibición de la adenilato ciclasa y, por lo tanto, en el descenso de los niveles de AMPc intracelular, inhibiéndose la actividad del factor de transcripción CREB (Pertwee, 1997; Busch y col., 2004).

Ambos receptores activan, también, la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de manera dependiente de la activación de proteínas G<sub>i/o</sub> (Bouaboula y col., 1995; Wartmann y col., 1995; Bouaboula y col., 1996). La activación de las MAPK se ha relacionado con el aumento de la expresión del gen krox-24, implicado en el crecimiento celular (Bouaboula y col., 1996). Otros autores relacionan la acumulación sostenida de ceramida y la activación de la MAPK ERK con la apoptosis inducida por THC de células de glioma C6 (Galve-Roperh y col., 2000). Además, en la activación de ceramidas como segundo mensajero se ha observado que el receptor puede estar acoplado al sistema efector a través de la proteína FAN (Sánchez y col., 2001). De igual manera, aunque no se conoce con exactitud la vía de señalización, los cannabinoides modulan el factor de transcripción NF-κB (Kaminski y col., 1998).

Los receptores CB<sub>1</sub>, pero no los CB<sub>2</sub>, por medio de proteínas G<sub>i/o</sub> regulan negativamente canales iónicos de tipo -N y -P/Q (Mackie y Hille, 1992; Mackie y col., 1995; Twitcheell y col., 1997) y positivamente canales rectificadores de potasio (GIRK) (Henry y Chavkin, 1995; Mackie y col., 1995) y a canales dependientes de voltaje de tipo A (Deadwyler y col., 1995). Por un mecanismo que no se ha demostrado de forma concluyente que esté mediado por receptor, los cannabinoides bloquean la corriente de canales dependientes de serotonina (Fan, 1995) y de canales de sodio dependientes de voltaje (Turkanis y col., 1991).

Por otro lado, en los últimos años un número importante de investigaciones han demostrado la capacidad de los cannabinoides de regular la actividad de otros receptores y, por tanto, actuar de forma sinérgica con sus señales de transducción. Este es el caso de los receptores opioides, vanilloides (TRPV1), 5-HT<sub>3</sub> de serotonina, NMDA o incluso colinérgicos (Demuth y Molleman, 2006).

#### **4.5 Fisiología del sistema cannabinoide.**

Dada la amplia distribución de los receptores cannabinoides en el organismo, es posible distinguir entre los efectos fisiológicos del sistema endocannabinoide en los sistemas inmunitario (Cabral y Marciano-Cabral, 2005; Croxford y Yamamura, 2005), respiratorio (Tashkin y col., 2002), cardiovascular (revisado por Jones, 2002; Pacher y col., 2005), gastrointestinal (Massa y Monory, 2006), reproductor (Wang y col., 2006), ocular (Tomida y

col., 2004) y el SNC.

**Efectos de los cannabinoides sobre el SNC:** La gran mayoría de los estudios se centran en los efectos de los cannabinoides sobre este sistema, de manera que, aparte de los efectos psicotrópicos que ocasionan y por los cuales son consumidos como sustancia recreacionales (euforia, sedación y relajación), se relaciona a los cannabinoides con analgesia, memoria y control del sistema motor, émesis y apetito. Así, los cannabinoides inducen analgesia al actuar principalmente sobre receptores CB<sub>1</sub> (Welch y col., 1995), aunque también parecen participar los receptores CB<sub>2</sub> a nivel periférico al modular la liberación de factores proinflamatorios en las inmediaciones de las neuronas nociceptivas (Malan y col., 2001). Además, se ha descrito que la administración de cannabinoides induce la síntesis y liberación de péptidos opioides endógenos en ratas (Manzanares y col., 1999) y que AEA y otros eicosanoides modulan la activación de receptores vanilloides (Zygmunt y col., 1999), lo cual podría explicar los efectos antinociceptivos de estos compuestos que no son bloqueados por antagonistas cannabinoides. El control de la nocicepción por parte del sistema endocannabinoide tiene una gran relevancia en el desarrollo de dianas terapéuticas para el tratamiento de patologías que cursan con dolor crónico, dolor neuropático, dolor agudo post-operatorio o derivado de otras patologías como cáncer o EM (Jhaveri y col., 2007).

Los estudios acerca de las propiedades orexígenas de los cannabinoides muestra que el sistema endocannabinoide controla el apetito, el peso y el equilibrio energético (Williams y Kirkham, 2002), en particular mediante la activación del receptor CB<sub>1</sub>. Estos hallazgos se ven confirmados por la observación de que la administración de antagonistas cannabinoides tiene un efecto terapéutico en pacientes obesos. De hecho, se encuentra en marcha un ensayo clínico en fase III con un agonista del receptor CB<sub>1</sub>, el Rimonabant, al que la Agencia Europea del Medicamento ha dado su visto bueno para su comercialización como agente terapéutico para esta condición patológica (Neovius y col., 2008).

Aún no se conoce con detalle el mecanismo por el cual los cannabinoides tienen propiedades antieméticas. Sin embargo, la activación de los receptores CB<sub>1</sub> en el núcleo del tracto solitario podría inhibir el vómito (van Sickle y col., 2001). Los cannabinoides podrían inhibir además la activación de receptores de serotonina 5-HT<sub>3</sub> en neuronas ganglionares de rata (Fan, 1995).

Tanto los estudios de comportamiento (Campbell y col., 1986; Lichtman y col., 1995) así como los relatos de consumidores habituales de cannabis indican un patrón de alteraciones de memoria derivadas del consumo similar al observado en pacientes con disfunción hipocampal como el síndrome de Korsakoff o en la enfermedad de Alzheimer (Sullivan, 2000). Existen claras evidencias que indican que el receptor CB<sub>1</sub> podría ser el

principal mediador de estos efectos ya que se encuentra ampliamente distribuido en el hipocampo, y el antagonismo de dicho receptor revierte este efecto (Nava y col., 2001). Dado que la edad media de inicio de consumo de marihuana se ubica en la adolescencia, es importante concienciar a esta población sobre los deterioros en los procesos cognitivos y de memoria que conlleva el consumo crónico de cannabis.

Además de estar ampliamente distribuido en hipocampo, el receptor CB<sub>1</sub> es abundante en áreas de control motor como los ganglios basales y el cerebelo. Esto ha llevado a muchos grupos a estudiar el papel del sistema endocannabinoide sobre el control motor en situaciones fisiológicas y patológicas (Sañudo-Peña y col., 1999; Fernández-Ruiz y col., 2002). En particular se ha analizado el papel de este sistema en la enfermedad de Parkinson, en la corea de Huntington (Lastres-Becker y col., 2003), la enfermedad de Alzheimer (Ramírez y col., 2005), EM (Arévalo-Martínez y col., 2003). Se ha descrito que animales que desarrollan EAE presentan alteraciones en la densidad y/o activación de los receptores CB<sub>1</sub>, principalmente en las regiones motoras (Berrendero y col., 2001). Además, los efectos de los cannabinoides sobre la espasticidad podrían tener lugar sobre las terminales de motoneuronas (van der Kloot, 1994). De todas maneras, cabe destacar que la mejoría en la sintomatología motora que experimentan los ratones con TMEV-IDD se debe en gran parte al efecto inmunomodulador y antiinflamatorio de los cannabinoides (Arévalo-Martín y col., 2003; Ortega-Gutiérrez y col., 2005). Es importante resaltar aquí el trabajo de Arévalo-Martín y col. (2003) donde se observaba una potenciación de la remielinización en la médula espinal de ratones con TMEV-IDD tratados con cannabinoides. Estos hallazgos sugieren que el sistema endocannabinoide se presenta como una potencial diana terapéutica en situaciones de desmielinización y lesión medular.

**Efecto de los cannabinoides sobre el sistema inmunitario:** Las primeras observaciones sugerían que el consumo de marihuana se relacionaba con un aumento de la susceptibilidad a padecer infecciones virales y con una potenciación de los episodios alérgicos (Sidney y col., 1997; Klein y col., 1998). Estudios de laboratorio mostraron que los cannabinoides modifican los niveles de citoquinas liberadas en respuesta a distintos estímulos proinflamatorios, tanto *ex vivo* en roedores y en humanos, como *in vitro* en cultivos de microglía, macrófagos o monocitos de roedores y de humanos (Nakano y col., 1992; Zhu y col., 1995; Cabral y col., 2008). En general la tendencia de los cannabinoides es la de regular a la baja los niveles de las citoquinas proinflamatorias como IFN- $\gamma$  (Ehrhart y col., 2005), IL-2 (Nakano y col., 1992), IL-1 $\beta$ , IL-12, TNF- $\alpha$  e IL-6; mientras que aumentan los niveles de las citoquinas antiinflamatorias como IL-10 e IL-4 (Molina-Holgado y col., 2002a; Klein y col., 2003).

La abundancia de receptores CB<sub>2</sub> en células del sistema inmunitario llevó al estudio

de los efectos de los cannabinoides en la función inmune. El análisis de la expresión del receptor CB<sub>2</sub> en los diferentes componentes del sistema inmune presenta grandes similitudes entre el ser humano y el ratón, encontrándose una densidad variable y gradual de en linfocitos B > células NK > monocitos > neutrófilos > linfocitos T CD8<sup>+</sup> > linfocitos T CD4<sup>+</sup>. Los primeros estudios sobre el efecto del uso de cannabis sobre las subpoblaciones linfocitarias en consumidores habituales de marihuana no estuvieron exentos de contradicciones, ya que mientras algunos autores observaban un descenso en la proliferación de linfocitos T (Nahas y col., 1974; Petersen y col., 1976), otros no observaban ningún efecto (White y col., 1975; Lau y col., 1976). Posteriormente, estudios *in vitro* demostraron que la modulación de la proliferación de linfocitos ocurría en una manera dependiente de la dosis, de tal forma que a dosis bajas incrementan la proliferación de estas células mientras que a dosis bajas se obtiene un efecto contrario (Klein y col., 1985; Luo y col., 1992, Derocq y col., 1995). Estos resultados han sido confirmados en estudios *in vivo* con gliomas y, aún cuando el mecanismo de acción de los cannabinoides no se conozca en detalle, se abren nuevas expectativas en cuanto a la capacidad de estos compuestos de inducir apoptosis en linfocitos T activados (Sánchez y col., 2006) en el tratamiento de enfermedades autoinmunes o en los procesos de rechazo de trasplantes. Últimamente se ha prestado mayor atención al efecto de los cannabinoides en la activación de los linfocitos T y a su capacidad de regular el equilibrio entre los subtipos Th1 y Th2 mediante la regulación de citoquinas. De hecho, estudios con THC han mostrado que se induce una disminución de las citoquinas propias de la respuesta Th1 (IL-12, IL-2 e IFN- $\gamma$ ) y un aumento de aquellas características de la respuesta Th2 (IL-10 e IL-4). Es decir, que en situaciones de infecciones oportunistas con *Legionella pneumophila*, los cannabinoides tendrían la capacidad de dirigir una respuesta inmunitaria mediada por células hacia una respuesta humoral (Yuan y col., 2002; Lu y col., 2006).

En relación con los linfocitos B, también se han descrito en la literatura un aumento de la proliferación de estas células con dosis bajas de cannabinoides (Derocq y col., 1995; Lee y col., 1995), así como una disminución en los niveles séricos de inmunoglobulinas G en consumidores habituales de marihuana, conjuntamente con un aumento de los valores sanguíneos de inmunoglobulinas D y E. Además se han observado variaciones en la expresión de CB<sub>2</sub> en función del estado de diferenciación y activación linfocitaria en células B humanas (Carayon y col., 1998; Derocq y col., 2000).

Los primeros estudios sobre el efecto de los cannabinoides en las células de estirpe mieloide se realizaron en macrófagos alveolares de consumidores crónicos de marihuana, en los que se valoró la capacidad fagocítica y metabólica de los mismo sin encontrarse cambios significativos (Mann y col., 1971; Drath y col., 1979). Contrastando con estas ob-

servaciones, los experimentos realizados con macrófagos peritoneales de ratón y con líneas celulares macrofágicas en cultivo mostraron una inhibición de la función celular al inhibir la quimiotaxis y la fagocitosis a altas dosis (McCoy y col., 1999).

Las primeras evidencias sobre la regulación de la producción de citoquinas datan de los numerosos estudios en los que demostraron que los cannabinoides reducían la producción de IFN $\gamma$  *in vivo* y *ex vivo*, así como de IFN $\alpha$  e IFN $\beta$  (Cabral y col., 1989). En situaciones de inflamación del SNC, como la EM, las células T CD4<sup>+</sup> de fenotipo Th1 producen citoquinas proinflamatorias como IL-2, IFN $\gamma$  y TNF $\alpha$ , implicadas en la activación de macrófagos y microglía, inflamación y daño tisular. Por el contrario, las células Th2 producen IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13, las cuales median la respuesta humoral e inhibe numerosas funciones inflamatorias de los macrófagos y en particular en células microgliales. En especial se ha observado una potenciación de la síntesis de IL-6 así como una inhibición de TNF $\alpha$  tras el tratamiento con AEA de astrocitos activados por el virus de Theiler en cultivo (Molina-Holgado y col., 1997). También se ha registrado en microglía un efecto inhibitorio de los cannabinoides sobre la producción de TNF $\alpha$  e IL-1 $\beta$  en respuesta al LPS (Puffenbarger y col., 2000; Molina-Holgado y col., 2003).

Dada la importancia de la microglía en el establecimiento de la respuesta inflamatoria y su papel central en el paso de la inmunidad innata a la adquirida en el parénquima nervioso, numerosos trabajos se han orientado a estudiar a estas células como una potencial diana terapéutica al modular su activación así como la producción de citoquinas y mediadores inflamatorios por parte de las mismas (revisado por McCarty, 2006). Además, la microglía produce hasta veinte veces más endocannabinoides que las neuronas o los astrocitos (Walter y col., 2003) y durante situaciones de neuroinflamación el sistema endocannabinoide está altamente activado. Así, se ha detectado un incremento de los niveles de AEA en lesiones activas en pacientes con EM y que este aumento protegía a las neuronas del daño inflamatorio (Eljaschewitsch y col., 2006). Esta activación del sistema endocannabinoides así como la capacidad de estos compuestos de modular la producción de citoquinas por parte de las células microgliales, ha llevado al estudio del potencial uso terapéutico de los cannabinoides como moduladores de la respuesta inmune-inflamatoria (Rivest, 2006; Cabral y col., 2008). La administración de cannabinoides exógenos o la manipulación del sistema endocannabinoide produjo una disminución de la respuesta inflamatoria actuando fundamentalmente como moduladora de la activación microglial en distintos modelos animales de patologías que cursan con neuroinflamación, como Alzheimer (Ramírez y col., 2005; Campbell y Gowran, 2007), Parkinson (Sagredo y col., 2007), EM (revisión de Pertwee, 2007), accidente cerebro-vascular (Ashton y col., 2007), entre otros. Estos datos sugieren que la manipulación farmacológica del sistema endocannabi-

noide podría ser una potencial diana terapéutica por lo que el estudio de los mecanismos de acción implicados se perfila como un necesario campo de investigación a profundizar.





# Objetivos



Trabajos previos del laboratorio han demostrado un importante efecto terapéutico de los cannabinoides en un modelo animal de esclerosis múltiple primaria progresiva (TMEV-IDD). Este efecto se basaba en una mejora de la sintomatología motora, una activación del proceso de remielinización y una regulación de la respuesta inmune, que se traducían en un menor infiltrado linfocitario al parénquima del sistema nervioso central conjuntamente con una menor activación microglial.

El descubrimiento del sistema cannabinoide endógeno (receptores cannabinoides y ligandos específicos) ha significado un importante punto de partida para el estudio del efecto de los cannabinoides exógenos sobre el organismo. Además, la manipulación del tono endocannabinoide mediante el uso de inhibidores de su inactivación supone un mecanismo más fisiológico de abordaje terapéutico y por lo tanto de reducción de los efectos perjudiciales que podría presentar el tratamiento con cannabinoides exógenos.

Por lo tanto se ha planteado como primer objetivo el estudio de los efectos de la manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide mediante la administración de compuestos inhibidores de la recaptura de anandamida (OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub>), de un inhibidor de la enzima FAAH (araquidonilserotonina, AA-5HT) o la misma administración de AEA sobre síntesis de las citoquinas heterodiméricas IL-12 e IL-23. En el caso de la administración de los compuestos inhibidores de la recaptura de AEA se evaluó también el efecto sobre la funcionalidad motora, el grado de activación microglial y la producción de los mediadores inflamatorios NO, MHC II e IL-1B.

Dada la capacidad del sistema endocannabinoide de modular la respuesta inmune-inflamatoria, en particular la producción de citoquinas, se planteó como segundo objetivo el estudio de los mecanismos moleculares que utiliza AEA para regular la síntesis de las subunidades que componen a las citoquinas heterodiméricas IL-12 e IL-23 (receptores cannabinoides involucrados, vías de señalización, etc.). En particular se han evaluado las vías de las MAPKs y de PI3K/Akt y el papel de las mismas en la regulación de la síntesis de estas citoquinas. Además, se ha evaluado cómo la síntesis endógena de IL-10 modifica de manera autocrina la producción de IL-12 e IL-23.

Finalmente se han explorado los mecanismos moleculares de AEA que son independientes de receptores cannabinoides. AEA es susceptible de ser oxigenada por COX-2 para generar prostamida E<sub>2</sub>, molécula que contribuye a las acciones del endocannabinoide sobre las citoquinas heterodiméricas. Por lo tanto, el tercer objetivo planteado fue el de estudiar los mecanismos moleculares que controlan la actividad del promotor de IL-12p40. Asimismo, se ha estudiado como la participación de COX-2, de prostamida E<sub>2</sub> y de los receptores prostanoideos pueden modificar la actividad del promotor de IL-12p40 y su síntesis protéica.



# Materiales y Métodos



## 1.- Animales.

Para este estudio se utilizaron ratones hembras *Mus musculus* de las cepas Balb/c, SJL/J y CD1 (Jackson Laboratories) de 4-6 semanas de edad para la experimentación *in vivo* y recién nacidos (días post-natales 0 ó 1) para los experimentos *in vitro*. Los animales se mantuvieron en el Animalario del Instituto Cajal (CSIC; Madrid, España), con una temperatura ambiente de 22°C y sometidos a ciclos regulares de luz/oscuridad de 12 horas. Se les proporcionó comida y agua *ad libitum* (dieta estándar, Harlam). Para la experimentación tanto *in vivo* como *in vitro* se siguieron las directivas y normativa vigente de la Unión Europea sobre el uso de animales de laboratorio (86/609/EEC).

### 1.1.- Inoculación de los animales con el virus de Theiler.

El virus de Theiler (TMEV) fue inoculado en ratones hembras de la cepa susceptible SJL/J entre las cuatro y seis semanas de edad. Los animales fueron infectados intracranalmente en el hemisferio derecho con 10<sup>6</sup> unidades formadores de placa (ufp) de la cepa Daniel (DA) del TMEV en 30 µl de medio DMEM suplementado con 5% de suero fetal bovino (FCS).

### 1.2.- Estudios conductuales.

Para evaluar el daño neurológico de los ratones causado por la infección con el TMEV (TMEV-IDD) se utilizaron dos pruebas conductuales: el *rotarod*, que mide la el equilibrio, la coordinación y el control motor; y el *actímetro* que evalúa la deambulación espontánea (actividad locomotora), la actividad exploratoria y la parapesia (compromiso de las extremidades inferiores).

a)- *Rotarod*: el aparato del rotarod (Ugo Basile; Italia) consiste en un rodillo suspendido capaz de girar a velocidad constante o con aceleración. El sistema posee además un cronómetro que se detiene cuando el animal cae del rodillo a una tecla ubicada en la parte inferior del aparato. Todos los ratones fueron expuestos a un período de entrenamiento y velocidad constante para que se familiarizaran con el aparato previo al tratamiento. Las pruebas se realizaron un día antes del inicio del tratamiento y un día después del fin del mismo. Se consideró terminada la prueba cuando el ratón caía de la barra o luego de una permanencia en la misma de 5 minutos.

b)- *Actímetro*: El estudio de la actividad locomotora se realizó mediante un actímetro (Activity Monitor System Omnitech Electronics, Inc.; Colombus, EEUU) acoplado a un

analizador Digiscan. Este aparato consiste en una jaula de metacrilato rodeada por sensores de tal manera que registra los movimientos horizontales y verticales del animal. Cada sesión duraba 10 min. dividida en dos sesiones de 5 min. cada una (1-5 min.: 1; 5-10 min.: 2), recolectándose los datos en cada caso: i) actividad horizontal, como el tiempo de duración (seg.) recorridos por el animal, y ii) actividad vertical, como el número total de interrupciones al haz del láser del sensor vertical.

Los datos fueron analizados mediante un análisis de varianza (ANOVA) seguidos del test *post hoc* de comparación múltiple de Tukey. Para el caso de datos múltiples obtenidos de medidas repetidas de un mismo individuo, se utilizó un ANOVA para medidas repetidas.

### 1.3.- Tratamientos.

*a)- Tratamiento con inhibidores de la recaptura de AEA:* una vez establecida la sintomatología de la enfermedad, valorada evaluando la función motora, los animales fueron tratados con los inhibidores selectivos del transportador de AEA, OMDM<sub>1</sub> u OMDM<sub>2</sub> (7mg/kg). El tratamiento se realizó mediante la inyección intraperitoneal subcrónica de dichos compuestos durante diez días o bien el vehículo correspondiente (5% de suero fetal bovino y 0,2% de DMSO en tampón fosfato pH=7,4). Las dosis fueron calculadas en base a la afinidad de los compuestos por los receptores cannabinoides (Ortar y col., 2003). Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus médulas espinales fueron extraídas por extrusión para el análisis histológico o la extracción del ARN total, según correspondiera.

*b)- Tratamiento con el inhibidor de FAAH:* a los ochenta días post-infección con el virus de Theiler y una vez establecida la sintomatología de la enfermedad, los animales fueron tratados con el inhibidote de la enzima FAAH, AA-5HT (5mg/kg). El tratamiento se realizó por inyección peritoneal subcrónica de dicho compuesto durante diez días o bien del vehículo correspondiente 5% de suero fetal bovino y 0,2% de DMSO en tampón fosfato pH=7,4). Una vez finalizado el tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus médulas espinales fueron extraídas por extrusión para el análisis histológico o la extracción del ARN total, según correspondiera.

### 1.4.- Cirugía para la implantación de las minibombas osmóticas.

A los ochenta y tres días post-infección con el virus de Theiler, se anestesiaron a los ratones mediante la inyección intraperitoneal con una solución de 3-bromoetanol al 10%.



Posteriormente se procedió a realizar un pequeño corte en la piel con un bisturí a la altura de la cintura escapular. Se introdujo una tijera de puntas curvas con la cual se separó la piel del músculo y se creó un bolsillo donde se introducirá a continuación la bomba osmótica. (1µl/h durante 7 días, Alzet modelo 2001; Cupertino, EEUU), la cual había sido previamente cargada con vehículo (PBS con 0,1% de etanol) o con una solución de AEA en vehículo. La cantidad de AEA se calculó para que la concentración del endocannabinoide liberado fuera de 3,5 mg/µL. El corte se cerró con grapas y se desinfectó la herida. Los animales fueron monitorizados para descartar que la dosis utilizada de AEA afectara sus parámetros motores y conductuales.

Pasados los siete días de administración de AEA, se procedió a sacrificar los animales con una dosis letal de pentobarbital sódico (50mg/kg de peso corporal), seguida de una perfusión con PBS. A continuación se extrajeron las médulas por extrusión para la consiguiente obtención y purificación del ARN mensajero total.

### **1.5.- Obtención de la médula espinal y su procesamiento para inmunohistoquímica.**

Una vez concluido el tratamiento correspondiente, los ratones fueron anestesiados mediante la administración peritoneal de pentobarbital (50mg/kg de peso corporal), perfundidos transcardíacamente con tampón fosfato 0,1M pH=7,4 (PB) y a continuación con paraformaldehído (PFA) al 4% en PB.

La médula espinal fue obtenida por extrusión. Para ello se realizaron sendos cortes a nivel lumbar y cervical y mediante una jeringa cargada con PB se ejerció presión hidrostática sobre el canal medular. El tejido extraído fue post fijado en paraformaldehído al 4% en PB durante toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con PB y se procedió a crioprotegerlo con una solución de sacarosa al 30%, para luego ser embebido en resina de montaje Tissue Teck (Sakura; Zoeterwoude, Holanda), congelados en hielo seco y cortado en criostato en secciones transversales de 30µm de grosor. Estas secciones se conservaron en Solución de Olmos (30% de sacarosa, 1% de polivinilpirrolidona y 30% de etilenglicol en PB). a -20°C hasta su posterior procesamiento para inmunohistoquímica.

### **1.6.- Inmunohistoquímica.**

*a)- Inmunofluorescencia:* las secciones de médula espinal se lavan tres veces con PB durante 10 min cada vez y se permeabilizan TritonX-100 al 0,2% en PB durante 30 min. Se repiten los lavados para eliminar el exceso de detergente y se bloquean las uniones inespecíficas con una solución al 3% del suero del animal en el que se hayan generado los an-

ticuerpos secundarios durante 1 hora. Se incuban los cortes con el anticuerpo primario anti-CD11b (dilución 1:250; Serotec LTD, Londres, Reino Unido), toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizan tres lavados, de 10 min cada uno, con 0,2% de TritonX-100 en PB para eliminar el exceso de anticuerpo primario. Se procede entonces a incubar con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con Alexa-Green (dilución 1:1.000; Molecular Probes, Eugene, EEUU) a temperatura ambiente y en oscuridad. Pasado ese tiempo se realizan tres lavados, de 10 min cada uno, con 0,2% de TritonX-100 en PB y otros tres lavados con PB. Se montan los cortes en portaobjetos gelatinizados y se los cubre con medio de montaje Inmu-Mount (Shandon, Pittsburgh, EEUU) y cubreobjetos.

*b)- Marcaje con Diaminobenzidina (DAB):* los cortes se lavan tres veces con PB durante 10 min cada vez. Se inhiben las peroxidasas endógenas incubando 30 min con una solución de 50% metanol y 1% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en PB. Se permeabiliza en tejido con 0,2% de TritonX-100 en PB durante 30 min. Se repiten los lavados para eliminar el exceso de detergente y se bloquean las uniones inespecíficas con una solución al 3% del suero del animal en el que se hayan generado los anticuerpos secundarios durante 1 hora. Se incuban los cortes con el anticuerpo primario anti-CD11b<sup>+</sup> (dilución 1:250, Serotec LTD, Londres, Reino Unido) o con lectina de tomate (lectina biotinilada de *Lycopersicon esculentum*; Sigma, Madrid, España) toda la noche a 4°C. Posteriormente se realizan tres lavados, de 10 min cada uno, con 0,2% de TritonX-100 en PB para eliminar el exceso de anticuerpo primario o de lectina. En el primer caso se procede a incubar con el anticuerpo secundario anti-rata conjugado con biotina (dilución 1:1000; Vector Laboratories Inc., Burlingame, EEUU) durante una hora a temperatura ambiente. Pasado ese tiempo se realizan tres lavados, de 10 min cada uno, con PB. Posteriormente se incuban los cortes con la avidina-peroxidasa (dilución 1:1000; Vector Laboratories Inc., Burlingame, EEUU) durante una hora a temperatura ambiente. Se realizan tres lavados de 10 min cada uno con PB y se procede a revelar con DAB (diaminobenzidina al 0,025% y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> al 0,003% en PB). Se lavan las secciones tres veces con PB durante 10 min cada vez y se montan los cortes en portaobjetos gelatinizados. Se los deja secar toda la noche y se deshidratan mediante pasaje por soluciones etanólicas de concentración creciente y se finaliza con la inmersión en xileno durante 10 min. Posteriormente se cubren con medio de montaje DePex (AMS Biotechnology; Oxon, Reino Unido) y cubreobjetos.

Tanto en el caso de la inmunofluorescencia como en el marcaje con DAB se realizaron controles negativos que consisten en la omisión del anticuerpo primario. Este tipo de controles permite evidenciar las interacciones inespecíficas de los anticuerpos secundarios.

### 1.7.- Determinación de los niveles de endocannabinoides en médula espinal por HPLC-MS.

Los niveles de endocannabinoides en médula espinal de los distintos grupos de ratones y en cultivos de macrófagos fueron medidos por dilución isotópica y cromatografía líquida de alta presión acoplada a un espectrómetro de masas con ionización química (LC-APCI-MS). Brevemente, los extractos lipídicos de tejidos medulares se diluyeron en presencia de 50 pmoles de AEA o 2-araquidonoilglicerol (2-AG) deuterados (d8). Posteriormente fueron pre-purificados mediante cromatografía en “lecho abierto” de sílica (Fontana y col., 1995). Las mediciones se informan como pmoles de AEA o nmoles de 2-AG por gramo (g) de peso húmedo de tejido en el caso de las médulas espinales y de pmol (para ambos endocannabinoides) por mg de extracto lipídico en el caso de los macrófagos.

## 2.- Cultivos celulares.

Los cultivos celulares, tanto primarios como de líneas, fueron mantenidos en incubadores HEPA Class 100 (Termo Electron Corporation, Marieta, EEUU) a 37°C, en atmósfera humidificada y 5% de CO<sub>2</sub>.

Los medios de cultivo y reactivos químicos utilizados fueron los siguientes: Dubelcco's Modified-Eagle's Medium (DMEM), el suero fetal bovino (FCS), el suero de caballo (HS), la albúmina sérica bovina (BSA) al 7,5%, la penicilina/estreptomicina y el tampón fosfato salino pH=7,4 (PBS) son de Gibco-Invitrogen (Barcelona, España). La poli-D-lisina es de Sigma (Madrid, España). Las placas multipocillos y los flasks son de Falcon (Becton Dickinson Labware Europe, Le Point de Claix, Francia). Las placas Petri son de Sterilin (Bibby Sterilin Ltd., Stone, Staffs, Reino Unido).

Las drogas y materiales biológicos utilizados en los distintos tratamientos fueron los siguientes: lipopolisacárido de *Escherichia coli* (serotipo 026:B6, LPS) y anandamida (araquidonoiletanolamida, AEA) son de Sigma (Madrid, España). El interferón-gamma recombinante (IFN- $\gamma$ ), la interleuquina-10 recombinante (IL-10) y el anticuerpo anti-IL-10 son de PreproTech (Londres, Reino Unido). El virus de Theiler, de la cepa DA, fue un donativo del Dr. Moses Rodríguez del Departamento de Inmunología y Neurología de la Clínica Mayo (Rochester, EEUU). Los compuestos OMDM1 ((S)-N-oleoil tirosinol) y OMDM2 ((R)-N-oleoil tirosinol) fueron provistos por el Dr. Di Marzo (Istituto di Chimica Biomolecolare, Pozzuoli, Italia). Los antagonistas CB1 (SR1), SR141716A (N-piperidino-5-(4-clorofenil)-1-(2,4 diclorofenil)-4-metil-3-pirazol-carboxamide) y CB2 (SR2), SR144528 (-[1S]-endo-

1,3,3-trimetil biciclo [2.2.1]heptan-2-il]-5-(4-cloro-3-metilfenil)-1-(4-metilbenzil)-pirazol-3-carboxamide) fueron donaciones de Sanofi Recherche (Montpellier, Francia). El agonista CB2, JWH-133 ((6aR,10aR)-3-(1,1-dimetilbutil)-6a,7,10,10a-tetrahidro-6,6,9-trimetil-6*H*-dibenzo[b,d]pirano), los inhibidores de fosfatidilinosito 3-kinasa (PI3K), la wortmanina y el LY294002 (2-(4-morfolinil)-8-fenil-4*H*-1-benzopiran-4-ona) son de Tocris Cookson Ltd. (Bristol, Reino Unido). El inhibidor de MEK1 (inhibidor de la vía de las ERK1/2-MAPK), PD98059 (2'-Amino-3'-metoxiflavona); el inhibidor de la c-Jun N-terminal kinasa (JNK-MAPK), SP600125 (antra(1,9-cd)pirazol-6(2*H*)-one 1,9-Pirazoloantrona) y el inhibidor de la p38-MAPK, SB203580 (4-(4-fluorofenil)-2-(4-metilsulfinilfenil)-5-(4-piridil)1*H*-imidazol) son de Cell Signaling Technology® (Beverly, EEUU). El antagonista del receptor vanilloide VR1, la capsazepina ([N-(2-(4-clorofenil)etil]-1,3,4,5-tetrahidro-7,8-dihidroxi-2*H*-2-benzazepina-2-carbotioamida) es de Alexis Biochemicals (Lausen, Suiza). El antagonista de receptores EP1/2/3, AH6809 (ácido 6-isopropoxi-9-oxoxantene-2-carboxílico) y la prostaglandina-E<sub>2</sub>-etanolamida (Prostamida-E<sub>2</sub>, N-(2-hidroxietil)-9-oxo-11 $\alpha$ ,15*S*-dihidroxi-prosta-5*Z*,13*E*-dien-1-amida) son de Cayman (Ann Arbor, EEUU). El antagonista del receptor EP4, AH23848B fue provisto por GlaxoSmithKline (GSK; Herts, Reino Unido). El inhibidor específico de la enzima COX-2, NS-398 (N-(2-ciclohexiloxi-4-nitrofenil)metanosulfonamida) es de Calbiochem Novabiochem (La Jolla, EEUU). El inhibidor específico de FAAH, la araquidonoilserotonina (AA-5HT) fue provisto por el Dr. Vincenzo Di Marzo del *Istituto di Chimica Biomolecolare* (Pozzuoli, Nápoles, Italia).

## 2.1.- Cultivos primarios

### 2.1.1.- Cultivos de microglía de ratón.

La obtención de cultivos enriquecidos de microglía se realizó a partir de un cultivo primario mixto de glía procedente del encéfalo de ratones neonatos o postnatales de dos días como máximo, provenientes de cepas Balb/c, SJL/J o CD1 (Instituto Cajal, CSIC, Madrid). Se siguieron los protocolos establecidos por McCarthy y de Vellis (1980) y modificados por Molina-Holgado y col. (2001). El procedimiento se llevó a cabo en su totalidad en una campana de flujo laminar y con material estéril, empleándose una lupa de disección, luz fría y material de microcirugía autoclavado.

Brevemente, se sacrifican los animales por decapitación y se colocan las cabezas en una placa Petri con etanol al 70%. Posteriormente se las transfiere a otra placa Petri con medio DMEM y se extraen con cuidado los cerebros de la cavidad craneana pasándolos a su vez a otra placa Petri con medio DMEM. A continuación se procede a eliminar las me-

ninges y los vasos sanguíneos de los hemisferios y el tronco cerebral.

Una vez obtenidos los hemisferios y el mesencéfalo limpios, éstos son colocados en una nueva placa con medio DMEM y el tejido cerebral es homogeneizado mediante repetidos pasajes por una pipeta Pasteur con la punta flameada. Después de obtenido así el homogenizado, se traslada a un tubo de tipo Falcon de 50 mL y se lo centrifuga durante 5 min. a 1000 rpm. Por aspiración mecánica se elimina el sobrenadante y se resuspende el pellet en un volumen adecuado de DMEM con 10% de FCS, 10% de HS y 1% de antibióticos (de ahora en adelante se denominará como DMEM completo). Se siembra la suspensión en frascos de 75 cm<sup>2</sup> y se incuba a 37°C en atmósfera humidificada con un 5% de CO<sub>2</sub>.

Transcurridos 15 días se agitan los frascos en un agitador orbital, a 230 rpm durante 3 horas, para separar la microglía (la cual se adhiere más laxamente al tapiz de astrocitos). Pasado ese tiempo se recolectan los sobrenadantes y se centrifugan 5 min a 1000 rpm. A continuación se aspira mecánicamente el sobrenadante y se resuspende el *pellet* en 1 mL de DMEM completo. Posteriormente se procede a contar las células vivas en una cámara de Neubauer (Boeco; Alemania) mediante la exclusión del colorante supravital azul de Tripán. Una vez obtenido el número de células vivas se procede a sembrarlas en placas de 12 ó 24 pocillos a razón de  $0,5 \times 10^6$  células/mL y se incuban a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> para su posterior utilización.

### 2.1.2.- Cultivos de macrófagos peritoneales de ratón.

Tres días antes de la recolección de los exudados peritoneales, los animales fueron inyectados intraperitonealmente con 2 mL de una solución de tioglicolato al 5% (Sigma; Madrid, España). Los exudados se recolectaron por lavado peritoneal con Solución Salina Balanceada de Hanks (HBSS; Sigma, Madrid, España) fría. Se centrifugaron las células a baja velocidad y a temperatura ambiente durante 10 min para luego resuspenderlas en el tampón de lisis de Gey (7,0 g/l NH<sub>4</sub>Cl; 0,37 g/l KCl; 0,3 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>·12H<sub>2</sub>O; 0,024 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>; 1,0 g/l glucosa; 8,4 mg/l MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O; 7,0 mg/l MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O; 6,8 mg/l CaCl<sub>2</sub> y 45 mg/l NaHCO<sub>3</sub>). Después de 20 min de incubación a temperatura ambiente, las células fueron centrifugadas y resuspendidas en DMEM completo. A continuación se contraron las células en un hemocitómetro con azul de Tripán para distinguir las células vivas y se las sembró en placas de 12 pocillos a razón de  $0,5 \times 10^6$  células/mL. Posteriormente fueron incubadas a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de CO<sub>2</sub> hasta su posterior utilización.

### **2.1.3.- Cultivos de microglía humana.**

Se obtuvo el tejido cerebral de embriones humanos de 16-20 semanas de edad provenientes de abortos programados en el Hospital Universitario de Caen (Caen, Francia), donde fueron realizados estos experimentos, siguiendo todas las pautas de la legislación francesa concerniente al uso de material biológico de origen humano. Los tejidos fueron disociados mecánicamente, filtrados a través de una malla de nylon de 150  $\mu\text{m}$ , centrifugados a 1000 rpm durante 10 min. y resuspendidos en DMEM completo. Posteriormente fueron plaqueados en frascos de 75  $\text{cm}^2$  (Falcon; Le Pont de Claix, France) recubiertos con poli-D-lisina (Sigma; Madrid, España) e incubados a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$ .

Pasados 10-15 días de incubación, los frascos fueron agitados en un agitador orbital a 200 rpm durante 3 horas. Se recolectaron los sobrenadantes, se los centrifugó 10 min. a 1000 rpm, se descartó por aspiración el sobrenadante y se resuspendió el pellet con DMEM completo. Posteriormente se procedió al recuento de las células vivas mediante el colorante supravital azul de Tripán. Una vez obtenido el número de células vivas se procedió a sembrarlas en placas de 12 ó 24 pocillos a razón de  $0,5 \times 10^6$  células/mL y se incubaron a 37°C en atmósfera humidificada con 5% de  $\text{CO}_2$  para su posterior utilización.

### **2.2.- Líneas celulares.**

La línea celular de macrófagos murinos, RAW264.7 fue obtenida del Centro de Investigaciones Biológicas (CIB, CSIC; Madrid, España). La línea celular de microglía murina, BV2 fue obtenida de Interlab Cell Line Collection (ICLC) del Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro (Génova, Italia). En ambos casos se utilizaron células obtenidas de un bajo número de pasajes. Las líneas celulares fueron cultivadas en medio DMEM completo y mantenidas a 37°C en atmósfera humidificada y con 5% de  $\text{CO}_2$  hasta su posterior utilización.

### **2.3.- Tratamientos celulares.**

En todos los casos (cultivos primarios y de líneas), una hora antes de realizar los experimentos, el medio completo se reemplazó por DMEM sin suero. Posteriormente se procedió a tratar las células siguiendo diferentes protocolos de tratamiento que se detallan en los resultados. Las dosis utilizadas fueron LPS 50 ng/mL; IFN $\gamma$  100 U/mL; AEA: 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ; SR1 1mM; SR2 1mM; OMDM $_1$  5 y 10  $\mu\text{M}$ ; OMDM $_2$  10  $\mu\text{M}$ ; AA-5HT 100nM, 1, 5 y 10  $\mu\text{M}$ ;

capsazepina 10 $\mu$ M; prostamida-E2 100nM, 1 y 10 $\mu$ M; NS-398 10 $\mu$ M, AH6809 10 $\mu$ M; AH23848B 30 $\mu$ M; IL-10 ng/mL; anticuerpo anti-IL-10 5 $\mu$ g/mL; JWH-133 100nM, 1 y 10 $\mu$ M; PD89059 10 $\mu$ M; SP600125 10 $\mu$ M; SB203580 25 $\mu$ M; wortmanina 100nM y LY294002 10 $\mu$ M.

En ciertos experimentos se procedió a realizar un pre-tratamiento de 8 horas con LPS/IFN $\gamma$  para inducir la expresión de COX-2. Pasado ese tiempo se lavó el medio con DMEM sin suero y se procedió a realizar los diferentes tratamientos.

#### **2.4.- Infección *in vitro* de cultivos de microglía y de macrófagos con el virus de Theiler.**

Los cultivos de macrófagos (provenientes de ratones SJL/J) o de microglía fueron infectados *in vitro* con la cepa DA del virus de Theiler a una dosis de  $1 \times 10^5$  de unidades formadoras de placa (PFU)/mL, lo que corresponde a una multiplicidad de infección (MOI) de 5 PFU/célula.

Los cultivos fueron lavados dos veces para eliminar los componentes séricos y 0,25 mL de una dilución apropiada del virus fueron agregados a cada pocillo. Se incubó durante 2 horas a 37°C, tiempo suficiente para que se produjera la adsorción viral y a continuación se añadieron 0,75 mL de DMEM con 2% de FCS.

Ni la microglía ni los macrófagos infectados mostraron signos citopáticos a 24 horas post-infección.

#### **2.5.- Inmunocitoquímica.**

Los cultivos primarios de microglía o de macrófagos destinados para los experimentos de inmunocitoquímica se realizaron sobre cubreobjetos circulares que habían sido previamente recubiertos con poli-D-lisina. Las condiciones de siembra fueron similares a aquellos cultivos sin cubreobjetos.

Una vez realizados los experimentos correspondientes, se aspiraron los medios y se realizaron tres lavados de 10 min cada uno con PBS frío. A continuación se procedió a fijar las células con PFA al 4% durante 15 min. Posteriormente se lavó el exceso de PFA con tres lavados de 10 min cada uno con PBS. Se permeabilizaron y bloquearon las células con una solución que contenía 5% de BSA y 0,1% de TritonX-100 en PBS durante 1 hora. A continuación se incubaron las células con los anticuerpos primarios a la dilución recomendada para cada uno de ellos durante toda la noche a 4°C. Los anticuerpos utilizados fueron: anti-CD11b (dilución 1:500) y anti-I-A (dilución 1:1000), ambos de Serotec Ltd (Londres, Reino Unido). Al día siguiente se lavó el exceso de anticuerpo primario con PBS y se incu-

baron las células con los anticuerpos secundarios a las concentraciones recomendadas a temperatura ambiente, durante 1 hora y en oscuridad. Los anticuerpos secundarios utilizados fueron: anti-ratón IgG-Alexa 488 (dilución 1:1000) y anti-rata IgG-Alexa 594 (dilución 1:1.000) de Molecular Probes (Eugene, EEUU). Se lavó el exceso de anticuerpo secundario con PBS y los cubreobjetos fueron montados en portaobjetos sobre el medio de montaje para inmunofluorescencia “Immu-Mount” de Thermo Shandon (Pittsburgh, EEUU). Se dejó secar el medio de montaje en una cámara húmeda y protegido de la luz.

Las imágenes se obtuvieron con un microscopio invertido Leica DMI6000 B (Leica Microsystems; Wetzlar, Alemania) y con objetivos de 40 y 100 aumentos.

## **2.6.- Citometría de flujo.**

Para los experimentos de citometría de flujo (FACS) se plaquearon células a una densidad de  $10^6$  cel/mL. A continuación se levantaron las células mediante un rascador de plástico, se las centrifugó y resuspendió con tampón de bloqueo (5% de FCS y 0,1% de azida sódica en PBS) durante 30 min. a 4°C. Posteriormente se realizaron tres lavados con el tampón de marcaje (2% de FCS y 0,1% de azida sódica en PBS) y se incubaron con el anticuerpo anti-MHC II (I-Ak) de ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (anti MHC II:FITC, dilución 1:1000) de Serotec Ltd. (Londres, Reino Unido) a 4°C durante 30 min y en oscuridad. Otro grupo de células se incubó con una IgG:FITC irrelevante como control de isotipo. Una vez finalizada la tinción, se realizaron tres lavados con el tampón de marcaje y se fijaron las células con PFA al 1%. Se lavó el exceso de PFA y se resuspenden las células en PBS frío. Las muestras fueron analizadas en un citómetro de flujo EPICS XL FACScan (Beckman Coulter; Brea, EEUU).

## **3.- Técnicas de inmunodetección por separación electroforética de proteínas (Western Blot).**

Una vez realizados los distintos tratamientos, se retiró el sobrenadante (el cual será utilizado más tarde para determinaciones por ELISA). A continuación se lavaron las células con PBS frío y fueron lisadas en 50µL de tampón de lisis (10% de glicerol, 1% de Nonidet P-40, 1mM de EDTA, 1 mM de EGTA en tampón tris-salino [TBS] pH=7,6) con un cóctel de inhibidores de proteasas de Roche (Complete Mini, Roche Diagnostics GMBH; Mannheim, Alemania) conteniendo: fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF) 1 mM, leupeptina 50 µg/mL, aprotinina 10 µg/mL, benzamidina 5 mM, ortovanadato sódico 1 mM, fluoruro de sodio 2 mM, ditiotreititol (DTT) 5 mM.



Los extractos protéicos fueron transferidos a tubos Eppendorf limpios y se procedió a sonicarlos para favorecer la lisis total de las células. Posteriormente se centrifugaron los tubos a 4°C durante 15 min a 14.000 rpm. Se transfirieron los sobrenadantes lípidos a nuevos tubos Eppendorf y se tomó una alícuota de cada muestra para la determinación de las proteínas totales. Para ello se realizó la reacción de Bradford siguiendo las instrucciones del ensayo comercial de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories; Hercules, EEUU).

Al extracto total de proteínas se le añadió un tampón de carga cinco veces concentrado, cuya composición consistía en: Tris-HCl (pH=6,8) 31,2 mM; SDS 1%, glicerol 2%,  $\beta$ -mercaptoetanol 0,19 M y azul de bromofenol 0,002% (tampón Laemmli). Las muestras se hirvieron durante 5 min para desnaturalizar las proteínas y se cargaron 30 $\mu$ g de proteínas totales en un gel de poliacrilamida al 10% con SDS. Se corrieron las muestras por electroforesis a 100 V durante 2 horas. Posteriormente se realizó la electrotransferencia de las proteínas a membranas de nitrocelulosa (Amersham Biosciences; Barcelona, España) durante 70 min a 100 V.

Las membranas fueron lavadas tres veces con TBS/Tween 0,1% (TTBS) para eliminar el exceso de metanol del tampón de transferencia y se procedió a bloquearlas durante 1 hora a temperatura ambiente con una solución al 5% de leche descremada (Sveltese, Nestlé; Barcelona, España) en TTBS (TTBS-leche). Posteriormente se incubaron las membranas con el anticuerpo primario correspondiente a la concentración adecuada para cada caso durante toda la noche a 4°C. Se utilizaron los siguientes anticuerpos primarios: anti-iNOS (dilución 1:2000) de Calbiochem (La Jolla, EEUU), anti-COX-2 (1:2500) y anti-FAAH (1:1000) de Cayman (Ann Arbor, EEUU), anti-fosfo-ERK1/2 (1:1000), anti-ERK1/2 total (1:1000), anti-fosfo-JNK (1:1000), anti-JNK total (1:1000), anti-fosfo-p38 (1:1000) y anti-p38 total (1:1000) de New England Biolabs (Beverly, EEUU). En todos los casos se utilizó la tubulina como control de carga y para ello se denudaban las membranas mediante incubación a 70°C durante 30 min. en tampón de “stripping” ( $\beta$ -mercaptoetanol al 0,7% y SDS al 2% en Tris-HCl [pH 6.8] 62.5mM). Una vez realizados los lavados y el bloqueo correspondiente, se reincubaron las membranas con anti-tubulina (1:40000) de Sigma (Madrid, España).

Tras las incubaciones con los anticuerpos primarios, se lavaron las membranas con TTBS-leche y se incubó una hora a temperatura ambiente con el anticuerpo secundario correspondiente. Los anticuerpos secundarios anti-IgG de ratón, de conejo o de cabra conjugados con la peroxidasa de rábano (1:8000) son de Jackson Immuno-Research Laboratories (West Grove, España). Pasado ese tiempo se realizaron tres lavados con TTBS y se visualizaron las bandas correspondientes mediante un sistema comercial de detección por quimioluminiscencia (ECL) de Amersham Biosciences (Barcelona, España). La señal lumini-

nosa fue capturada en filmes fotosensibles (Hyperfilm™, Amersham Biosciences; Barcelona, España), revelada químicamente en un revelador de geles AGFA Curix60 (Agfa-Gevaert SAU; Madrid, España) y semi-cuantificadas por densitometría mediante un escáner GS-800 de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories; Hercules, EEUU).

#### **4.- Enzimoimmunoensayos en fase sólida (ELISAs).**

Para la determinación de las distintas citoquinas se recolectaron los sobrenadantes de los cultivos después de los distintos tratamientos, se centrifugaron y se transfirieron a un nuevo tubo Eppendorf, tomando alícuotas que se congelaron hasta el momento de realizar el ensayo. Este procedimiento se realizó tanto para los cultivos de ratón como para los cultivos humanos.

Las cantidades de IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-12 e IL-23 liberadas al medio de cultivo tras los distintos tratamientos fueron determinadas por ELISAs utilizando kits comerciales específicos y siguiendo las recomendaciones de los fabricantes.

En el caso del ensayo de IL-1 $\beta$  (BioSource Europe; Nivelles, Bélgica), la sensibilidad es de 7 pg/mL con un coeficiente de variación intra- e inter-ensayo de 4,4 $\pm$ 0,5% y 8,9 $\pm$ 0,9% respectivamente.

En el caso del ensayo de IL-12p40 y de IL-12 total (BioSource Europe; Nivelles, Bélgica), la sensibilidad es de 2 pg/mL con un coeficiente de variación intra- e inter-ensayo 3,3 $\pm$ 4,5% y 5,6 $\pm$ 6,4% respectivamente.

En el caso del ensayo de IL-23 (eBioscience; San Diego, EEUU), la sensibilidad es de 15 pg/mL con coeficientes de variación 4,9 $\pm$ 0,6% y 7,4 $\pm$ 0,35% respectivamente.

#### **5.- Reacción de cadena de la polimerasa (PCR).**

##### **5.1.- PCR convencional.**

Se obtuvo el ARN mensajero (ARNm) total a partir de cultivos celulares o bien de médula espinal de ratones mediante el kit de columnas de extracción RNAeasy® de Qia-gen (Hilden, Alemania). Muestras conteniendo 1  $\mu$ g de ARNm fueron transcritas en ADN complementario (ADNc) usando el Sistema de Transcriptasa Reversa de Promega (Madrid, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante. Las librerías de ADNc fueron amplificadas por PCR en un termociclador PTC-100 (MJ Research Inc.; Watertown, EEUU) con oligonucleótidos para la Gliceraldehído-3 fosfato dehidrogenasa (GAPDH), las subunidades de IL-12p35 (p35), IL-12p40 (p40), IL-23p19 (p19), IL-27p28 (p28), el gen-3 inducido por el

virus de Epstein-Barr (EBI-3), IL-10 e IL-4. Los productos de amplificación tenían 800, 300, 250, 190, 400, 500, 300 y 180 pares de base respectivamente.

Las secuencias para los cebadores de GAPDH son: sentido, 5'- CATTGACCTCAACTA-CATGGT-3'; antisentido, 5'- CATTGACCTCAACTACATGGT-3'. De p35 son: sentido, 5'- ATGACCCTGTGCCTTGGTAG-3'; antisentido, 5'- CAGATAGCCCATCACCTGT-3. De p40: sentido, 5'- AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3'; antisentido, 5'- AAAGCCAACCAAGCAGAAGA-3'. De p19: sentido, 5'- GACTCAGCCAACTCCTCCAG-3'; antisentido, 5'- GGCACTAAGGGCT-CAGTCAG-3'. De p28: sentido, 5'-GCTCAGCCTGTTGCTGCTACC-3'; antisentido, 5'- CCTGCAGCCAGCACCTGAAAGC-3'. De EBI-3: 5'- CCACTTACAGGCTCGGTGTGG-3'; antisentido, 5'- CCTGAGCTGACACCTGGATGC-3'. De IL-10: sentido, 5'- TGCACTACCAAAGCCACAAG-3', antisentido, 5'- TCATTTCCGATAAGGCTTGG-3'. De IL-4: sentido, 5'- TCAACCCCCAGCTAGTTGTC-3'; antisentido, 5'- TGTTCCTTCGTTGCTGTGAGG-3'.

Las condiciones de amplificación para la GAPDH fueron: desnaturalización a 94°C por 1 min., alineamiento de cebadores a 60°C por 1 min. y elongación a 72°C por 1 min. durante 35 ciclos. Para p35, p40, p28 y EBI-3 fueron: desnaturalización a 94°C por 1 min., alineamiento de cebadores a 50°C por 1 min. y elongación a 72°C por 1 min. durante 40 ciclos. Para p19, IL-10 e IL-4 fueron: desnaturalización a 94°C por 1 min., alineamiento de cebadores a 55°C por 1 min. y elongación a 72°C por 1 min. durante 35 ciclos.

Los productos de PCR fueron analizados en un gel de agarosa al 1,5% con bromuro de etidio (Sigma; Madrid, España) y mediante un transiluminador de luz ultravioleta.

## **5.2.- PCR cuantitativa (qPCR).**

Se obtuvo el ARN mensajero (ARNm) total a partir de cultivos celulares o bien de médula espinal de ratones mediante el kit de columnas de extracción RNAeasy® de Qia-gen (Hilden, Alemania) y se sometieron a un tratamiento con DNasa (Sigma; Madrid, España) para eliminar cualquier contaminación con ADN genómico. Muestras conteniendo 1 µg de ARNm fueron transcritas en ADN complementario (ADNc) usando el Sistema de Transcriptasa Reversa de Promega (Madrid, España) y siguiendo las instrucciones del fabricante.

Los cebadores y sondas para la TaqMan PCR de GAPDH, p35, p40 y p19 fueron diseñados por Applied Biosystems (Foster City, EEUU). Las sondas estaban marcadas en el extremo 5' con el fluoróforo 6'-carboxifluoresceína (FAM) y en el extremo 3' con el extinguidor ("quencher") 6'-carboxi-metil-rodamina (TAMRA).

Las secuencias de los cebadores para CB2 fueron: sentido, 5'- AGGAGCTGTCAGCTCAGGGTAT-3', antisentido, 5'-CTGCGCCCCTAAGGACCTA-3'; CB2 son-

da: FAM-5'-AGGGCCCTCCCGACATCCTGATAAG-3'-TAMRA.

Brevemente, se utilizó 1 µL de la librería de ADNc para la qPCR usando un Universal TaqMan Mastermix (Applied Biosystems; Foster City, EEUU), 100nM de cebadores y 50nM de sonda. Las condiciones de amplificación fueron: hibridación a 50 °C durante 2 min, desnaturalización a 95 °C durante 10 min seguidos de 50 ciclos de amplificación (95 °C por 15 s, 60 °C por 1 min). La qPCR fue llevada a cabo en un termociclador ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems; Foster City, EEUU) por duplicado y una curva estándar de cinco puntos. Para corroborar la ausencia de ADN genómico contaminante se realizaron controles con muestras ARN total (donde no se llevó a cabo la transcripción reversa).

La cuantificación relativa se obtuvo al realizar el cociente de los valores obtenido para los genes de interés por los valores de las correspondientes GAPDH.

## 6.- Transfecciones.

### 6.1.- Plásmidos.

Las construcciones plasmídicas que se utilizaron fueron generadas en el laboratorio del Dr. Stephen Smale de la Universidad de California-Los Ángeles (UCLA, EEUU) en el caso del p40/pGL2B y del Dr. Christoph Becker de la Universidad de Mainz (Alemania) en el caso de p40/pXP1 *wild type*, así como de los mutantes en ETS (ETSm-p40/XP1), en NF-κB (NFκBm-p40/pXP1), en C/EBPβ (C/EBPβm-p40/pXP1) y en GA-12 (GA12m1-p40/pXP1). Las secuencias de las mutaciones de dos pares de bases se detalla a continuación (las mutaciones están subrayadas): ETSm : 5'-CCCAAAAGTCATTAAACTCTTAGTTC-3'; NFκBm: 5'-GAATTCTTGAAATTAGCCAGAAAGG-3'; GA-12m1: 5'-CTCGTTTTTCTACACACAC-3'; GA-12m3: 5'-CTCGTTTTTGATACATCCCAC-3'; C/EBPβm : 5'-TGTTTTCAATGTTCTAACAAGTCAGT-3'.

### 6.2.- Ensayo de luciferasa.

Se cotransfectaron células RAW264.7 o BV2 con los plásmidos p40/pGL2B, p40/pXP1 o sus respectivos mutantes (los cuales contienen el gen para luciferasa como reportero) y el vector de expresión para la *Renilla* luciferasa (Promega; Barcelona, España). Para la transfección se utilizó el sistema de liposomas catiónicos (Lipofectamine™ Reagent, Invitrogen; Barcelona, España) siguiéndose las instrucciones del fabricante.

Dieciocho horas después de iniciada la transfección se cambió el medio por DMEM sin suero y se realizaron los tratamientos correspondientes. Al día siguiente se lavaron las

células con PBS y éstas fueron lisadas con un tampón de lisis pasiva (Promega; Barcelona, España) durante 5 min. A continuación se procedió a determinar la actividad luciferasa y la actividad *Renilla* mediante el kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System de Promega (Barcelona, España). Mediante este sistema se correlacionan la señal dada por la luciferasa (vector reportero experimental) con la de la *Renilla* (vector control interno de transfección). Al normalizar la señal del vector experimental con la del vector de control interno se reducen las variabilidades debidas a la toxicidad celular por el tratamiento, por la eficiencia de la transfección y por la proliferación. Las actividades luciferasa de ambos vectores se midieron como emisión de luz en un período de 10 s cada vez en un luminómetro estándar (Sirius, Berthold Detection Systems; Pforzheim, Alemania).

### 6.3.- Ensayo de oligonucleótidos señuelo (*Decoy oligonucleotides assay*).

Los oligonucleótidos señuelo (de ahora en adelante, *decoy*) de doble cadena fueron transfectados en células RAW264.7 para interferir la unión de factores de transcripción activados por la señal de LPS/IFN- $\gamma$ . Para ello se utilizó el sistema de liposomas catiónicos (Lipofectamine™ Reagent, Invitrogen; Barcelona, España) siguiéndose las instrucciones del fabricante.

Las secuencias de los oligonucleótidos decoy fueron las siguientes: decoy GA-12 wild type (dGA-12 wt): 5'-CTCGTTTTGATACACACACAGAGA-3' y decoy GA-12m1 (dGA-12m1): 5'-CTCGTTTTTCTACACACACAGAGA-3'. En subrayado se muestra la mutación puntual de dos pares de base del oligonucleótido decoy mutado en la secuencia GA-12.

Una vez realizadas las co-transfecciones de los oligonucleótidos decoy junto a los plásmidos experimentales y control interno (18 horas de reacción) se procedió a cambiar el medio por DMEM y se realizaron los correspondientes tratamientos. Al día siguiente se lavaron las células y se realizó la lectura de las actividades luciferasa y *Renilla* como se describió previamente.

## 7.- Estadística.

Los datos recogidos en cada experimento fueron analizados estadísticamente mediante el programa SPSS 13.0 y se presentan como la media aritmética  $\pm$  el error estándar de la media (SEM) de por lo menos tres experimentos distintos realizados por triplicado.

Los tests empleados fueron: ANOVA de una vía para los casos de comparaciones entre medias con una única fuente de variación, ANOVA de dos vías cuando las variables estaban influenciadas por dos fuentes de variación y ANOVA de medidas repetidas cuando se

analizó la evolución de cada animal según el tratamiento empleado. Las pruebas *a posteriori* fueron los tests de Tukey, Dunnet o de Bonferroni, dependiendo del análisis estadístico previo. Para ciertos experimentos fue necesario aplicar el análisis estadístico no paramétrico, la prueba U de Mann-Whitney.

Se consideraron como estadísticamente significativos los valores de p menores a 0,05.

# RESULTADOS





**1. Efecto de los inhibidores de la recaptación de endocannabinoides, OMDM1 y OMDM2, en la encefalomiелitis por infección con el virus de Theiler (TMEV-IDD) como modelo de esclerosis múltiple.**



La inoculación intracraneal del virus de Theiler (TMEV), un picornavirus entérico murino, en cepas susceptibles de ratones provoca una respuesta inflamatoria crónica desmielinizante que se utiliza con modelo animal de la esclerosis múltiple, en particular de su variedad primaria progresiva. Tras un período de latencia post-infección, en la fase crónico-temprana, se comienzan a detectar los primeros signos de la sintomatología característica como alteraciones motoras y de coordinación que pueden ser evaluadas mediante distintas pruebas comportamentales.

### 1.1 El tratamiento con OMDM1 u OMDM2 mejora la función motora en animales con deficiencias neurológicas establecidas.

Diversos estudios describen la capacidad disminuida de los animales infectados con el virus de Theiler en realizar pruebas conductuales que miden la actividad motora espontánea (actímetro) y la coordinación motora (test del rotarod) (McGavern y col., 1999; 2000). Los ratones infectados con la  $10^6$  ufp de la cepa Daniel del virus de Theiler mostraron una evidente afectación de la coordinación motora a los 40 días post-infección, permaneciendo menos tiempo en el rodillo en movimiento con aceleración constante. Los animales inyectados con vehículo permanecieron en el rodillo una media de  $159,2 \pm 15,5$  segundos, mientras que los ratones inoculados con el virus sólo permanecieron una media de  $69,06 \pm 9,6$  segundos (Fig. 1c,  $*p<0,05$ ). Los datos del actímetro demostraron una clara reducción tanto en los tiempos de actividad horizontal (deambulación espontánea) como de actividad vertical (“rearing”), en ambos ciclos de registro (primer ciclo: 0-5 min., se-

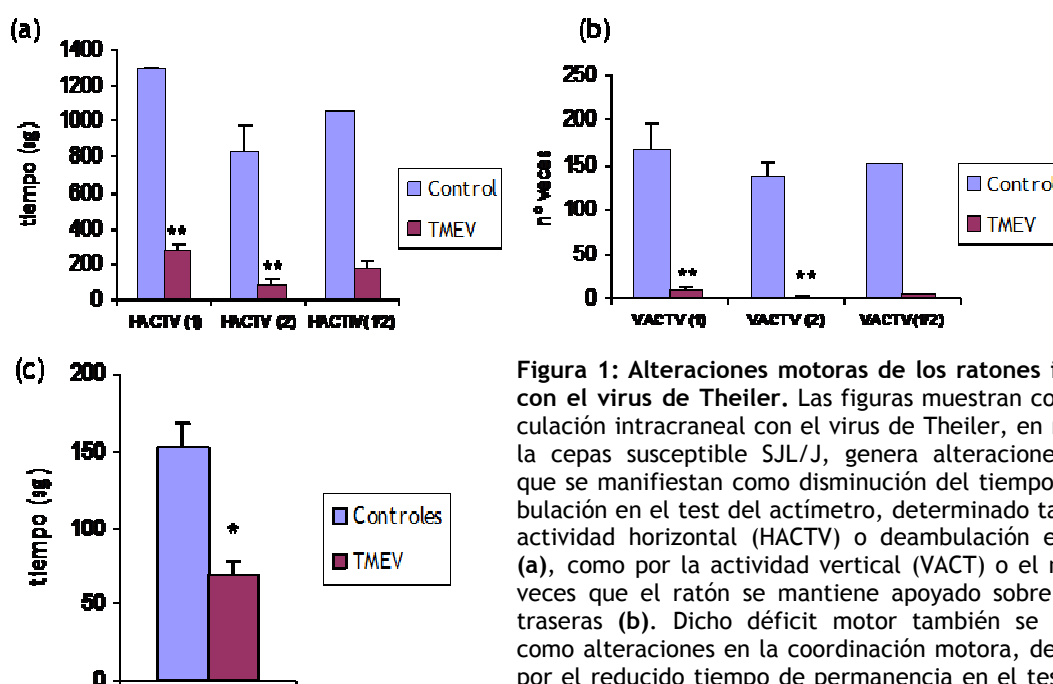


Figura 1: Alteraciones motoras de los ratones infectados con el virus de Theiler. Las figuras muestran como la inoculación intracraneal con el virus de Theiler, en ratones de la cepas susceptible SJL/J, genera alteraciones motoras que se manifiestan como disminución del tiempo de deambulación en el test del actímetro, determinado tanto por la actividad horizontal (HACTV) o deambulación espontánea (a), como por la actividad vertical (VACT) o el número de veces que el ratón se mantiene apoyado sobre sus patas traseras (b). Dicho déficit motor también se manifiesta como alteraciones en la coordinación motora, determinada por el reducido tiempo de permanencia en el test de rotarod.  $*p<0,05$  vs. Control;  $**p<0,01$  vs. Control.

gundo ciclo: 5-10 min.), confirmando de esta manera el déficit motor de los ratones infectados (Fig. 1a y 1b,  $**p<0,01$ ).

Trabajos previos de nuestro grupo con agonistas exógenos de receptores cannabinoides como WIN55,212-2 (agonista no selectivo  $CB_1$  y  $CB_2$ ), ACEA (agonista selectivo de  $CB_1$ ) o JWH015 (agonista selectivo de  $CB_2$ ) habían demostrado una mejoría significativa en la función motora de ratones con TMEV-IDD (Arévalo-Martín y col., 2003). Por lo tanto decidimos estudiar los efectos del aumento del tono cannabinoide endógeno mediante la administración de los inhibidores de la recaptación celular de endocannabinoides OMDM1 y OMDM2 (7mg/kg cada uno) en el modelo de Theiler.

Los ratones tratados con OMDM<sub>1</sub> mostraron una mejora en la capacidad de realizar correctamente las pruebas de coordinación motora (rotarod) al cabo de 10 días de tratamiento comparados a los animales tratados con vehículo (Fig. 2a,  $\#p<0,01$ ). En caso de OMDM<sub>2</sub> se observó una tendencia similar que no alcanzó significación estadística. La administración de estos compuestos no alteró la capacidad motora de los animales no infectados (“sham”), de acuerdo a lo observado en ratas (de Lago y col., 2004).

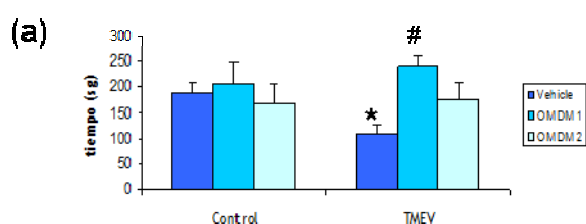
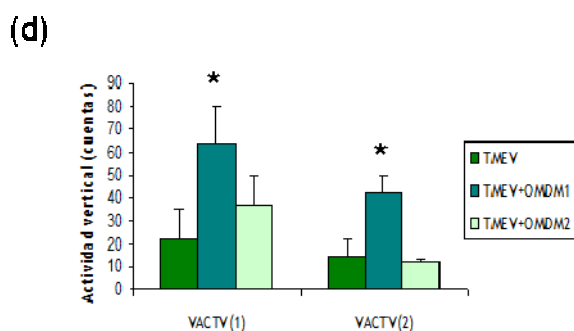
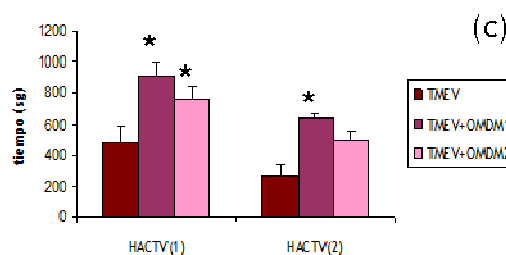
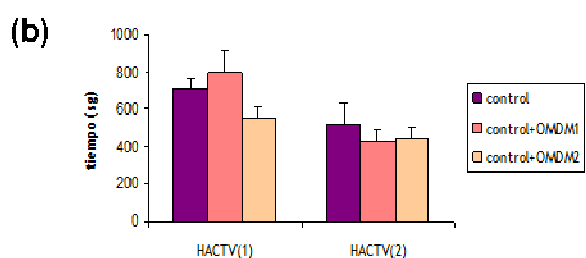


Figura 2: El tratamiento con los inhibidores de la recaptura de endocannabinoides, OMDM<sub>1</sub> u OMDM<sub>2</sub>, inducen una mejoría significativa en la actividad motora de ratones infectados con TMEV. (a) Después del tratamiento con OMDM<sub>1</sub> se observa una mejora en desarrollo del test de rotarod por parte de los ratones infectados, mientras que no afectó a los animales sanos ( $*p<0,05$  vs. Control;  $\#p<0,01$  vs. Vehículo). (b) El tratamiento con estos compuestos no alteró el desarrollo del test del actímetro por parte de los animales sanos.



(c) La administración tanto de OMDM<sub>1</sub> como de OMDM<sub>2</sub> produjo mejoras significativas los tiempos de deambulación espontánea, determinada en dos ciclos (5 min. cada uno) mediante el test del actímetro, en los ratones infectados con el TMEV. Durante el segundo ciclo del test, el tratamiento con OMDM<sub>2</sub> mostró una tendencia a mejorar los tiempos de deambulación espontánea, aunque sin alcanzar significación estadística. ( $*p<0,05$  vs. TMEV). (d) Asimismo, el tratamiento con OMDM<sub>1</sub> fue efectivo en aumentar los tiempos de permanencia de los ratones tratados sobre sus patas traseras ( $*p<0,05$  vs. TMEV) mientras que el tratamiento con OMDM<sub>2</sub> resultó inefectivo.

Asimismo, los resultados de actividad horizontal en el test del actímetro (Fig. 2b, 2c y 2d) mostraron una significativa mejoría motora en los ratones tratados con OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub>, en ambos ciclos de registro. Sin embargo, únicamente los ratones tratados con OMDM<sub>1</sub> mostraron una menor afectación de las patas traseras, reflejada en los valores obtenidos en la actividad vertical de este grupo experimental (Fig. 2d, \*p<0,05).

Una vez completado el protocolo de administración de los inhibidores de recaptación de endocannabinoides (setenta y un días post-infección), se sacrificaron los animales a fin de extraer sus médulas espinales para realizar la determinación de los niveles AEA y 2-AG. Los resultados obtenidos no revelaron diferencias significativas entre el grupo de los animales “sham” y los infectados con el virus de Theiler. Sin embargo, los animales tratados tanto con OMDM<sub>1</sub> como con OMDM<sub>2</sub> mostraron un aumento en los niveles de AEA en la médula espinal (Tabla 1, \*p<0,05), el cuál era más elevado en el caso de los ratones tratados con OMDM<sub>1</sub>. En ninguno de los casos los niveles de 2-AG se vieron modificados. Estos resultados sugieren que los efectos beneficiosos observados por la administración de los inhibidores de la recaptación de endocannabinoides podrían deberse únicamente al aumento de los niveles de AEA (Tabla 1).

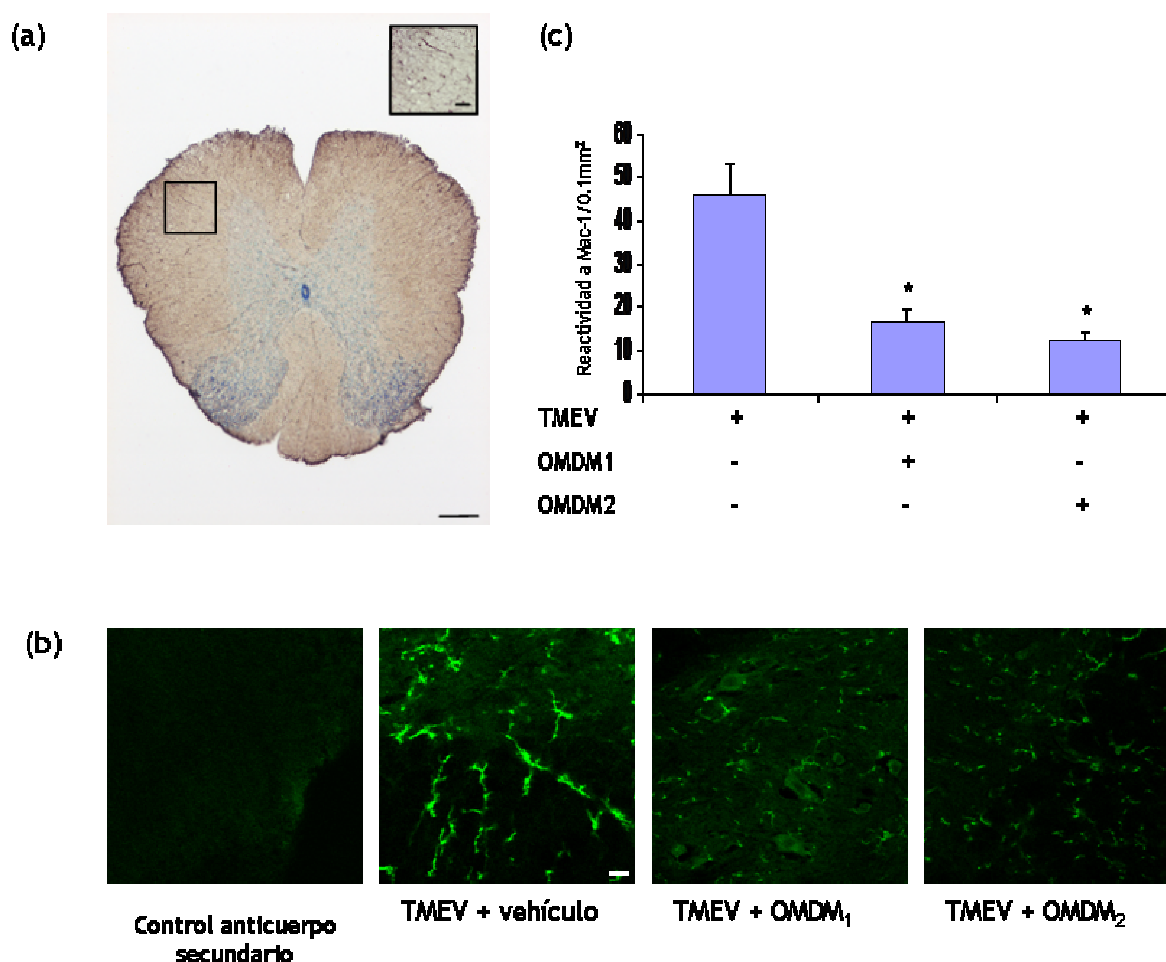
	<b>AEA</b> (pmol/g tejido)	<b>2-AG</b> (nmol/g tejido)
<b>Médula espinal + vehículo</b>	22.8 ± 3.7	4.8 ± 0.8
<b>Médula espinal + TMEV + vehículo</b>	28.7 ± 1.0	3.5 ± 0.5
<b>Médula espinal + TMEV + OMDM<sub>1</sub> (7 mg/kg)</b>	45.6 ± 3.0 *,#	2.8 ± 0.3
<b>Médula espinal + TMEV + OMDM<sub>2</sub> (7 mg/kg)</b>	33.6 ± 0.4*	2.9 ± 0.1

**Tabla 1: Niveles de AEA y de 2-AG en la médula espinal de ratones.** El tratamiento subcrónico durante 10 días con OMDM<sub>1</sub> u OMDM<sub>2</sub> (7mg/Kg respectivamente) induce un incremento significativo de los niveles de AEA en la médula espinal de ratones infectados con TMEV. Este incremento es superior en el caso de OMDM<sub>1</sub> (\*p<0,05 vs. TMEV; #p<0,05 vs. TMEV + OMDM<sub>2</sub>). En el caso de 2-AG no se observa incremento alguno.

## 1.2 Los compuestos OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> reducen la activación de macrófagos/microglia *in vivo*.

La inflamación desmielinizante causada por el TMEV se caracteriza por una activación macrofágica/microglial en la médula espinal y la producción de factores pro-inflamatorios y citotóxicos que contribuyen a la pérdida de mielina (Pope y col., 1996).

Trabajos previos de nuestro grupo habías mostrado que el tratamiento de ratones TMEV con agonistas cannabinoides reducían la activación microglial, incluso a los 25 días post-tratamiento (Arévalo-Martín y col., 2003). Por ello se procedió en este trabajo a evaluar el efecto de los inhibidores de la recaptura de endocannabinoides sobre la activación microglial mediante técnicas de inmunohistoquímica y fluorescencia. Como se muestra en las Fig. 3a y 3b, las células microgliales de la médula espinal de ratones infectados con TMEV evidenciaban la típica morfología reactiva tanto en la sustancia gris como en la sustancia blanca. El marcaje se realizó con lectina de tomate y se contrateñió con azul de Toluidina. En el caso de los ratones tratados con OMDM<sub>1</sub> o con OMDM<sub>2</sub> se constató una marcada disminución de la reactividad microglial. El inmunomarcaje fluorescente con el anticuerpo anti-CD11b permitió la cuantificación del grado de reducción de la reactividad microglial. El mismo se realizó mediante el programa de análisis de imagen AIS 6.0, hallán-



**Figura 3:** El aumento de los niveles de AEA reduce la reactividad microglial en la médula espinal de ratones infectados con TMEV. La inoculación intracraneal del virus de Theiler ( $10^6$  upf) desencadena una respuesta inflamatoria que se traduce en la aparición de células microgliales con morfología reactiva y positivas para el anticuerpo anti-CD11b<sup>+</sup>. (a) Microfotografía de una sección de médula espinal, marcada con lectina de tomate u contrateñida con Azul de Toluidina (barra de calibración: 50µm). (b) Marcaje inmunofluorescente de células CD11b<sup>+</sup> en secciones de médula espinal de ratones infectados con TMEV y tratados con OMDM<sub>1</sub> u OMDM<sub>2</sub> durante 10 días (7mg/kg). Barra de calibración: 50µm). (c) Cuantificación de las células CD11b<sup>+</sup> en las secciones de médulas espinales de ratones infectados y tratados (\*p<0,001 vs. TMEV).

dose un valor de reducción de aproximadamente el 65% para ambos compuestos (Fig. 3c).

### 1.3 Los compuestos OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> modulan la activación macrofágico/microglial *in vitro*.

Una vez establecidos los efectos de OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> sobre las funciones motoras y la reactividad microglial en la médula espinal, se procedió a realizar estudios *in vitro* con el objetivo de estudiar los efectos de dichos compuestos sobre la reactividad macrofágico/microglial en cultivos primarios.

Como primera aproximación se realizó la determinación de los niveles de endocannabinoides en cultivos primarios de macrófagos infectados con TMEV (MOI de 5 pfu/célula) y se los comparó con cultivos tratados únicamente con vehículo. Como puede observarse en la tabla 2, la infección *in vitro* de macrófagos elevó los niveles de AEA a casi el doble con respecto a los macrófagos tratados con vehículo (Tabla 2, \* $p < 0,05$ ) mientras que los niveles de 2-AG, si bien mostraban una tendencia a estar más elevados), no alcanzaron significación estadística. Estos datos coinciden con lo observado en la médula espinal de ratones tratados con inhibidores de la recaptación de endocannabinoides. De esta forma, parecería ser que el aumento de AEA es el responsable de los efectos antiinflamatorios de los OMDMs.

	AEA (pmol/mg extracto lipídico)	2-AG (pmol/mg extracto lipídico)
Macrófagos + vehículo	3.4 $\pm$ 0.8	4.2 $\pm$ 0.3
Macrófagos + TMEV	6.2 $\pm$ 0.9*	6.0 $\pm$ 1.9

Tabla 2: La infección *in vitro* de macrófagos con el virus de Theiles produce un aumento en los niveles de AEA. La infección de macrófagos peritoneales con TMEV (MOI de 5 ufp por célula) indujo un aumento significativo de los niveles de AEA (\* $p < 0,05$  vs. Vehículo). Los niveles de 2-AG mostraron una tendencia a aumentar aunque no se alcanzó significación estadística.

Las células macrofágico/microgliales cumplen un papel esencial en procesos inflamatorios y, gracias a su capacidad de presentar antígenos, son una pieza clave en el paso de la inmunidad innata a la inmunidad específica. Además, estas células expresan los receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Walter y Stella, 2004; Cabral y Marciano-Cabral, 2005), por lo que podrían responder a los endocannabinoides, incluso de una manera autocrina. Por otra parte, se ha demostrado un aumento en la producción de endocannabinoides, particularmente de AEA, en respuesta al tratamiento con LPS (Liu y col., 2003) y, como se

muestra más arriba, en respuesta a la infección con TMEV. Por lo tanto se procedió a evaluar si el inhibidor de la recaptura de AEA, el OMDM<sub>1</sub>, tenía algún efecto en la expresión de diversos mediadores de la inflamación y la presentación antigénica.

Las moléculas de MHC clase II presentes en la superficie celular de macrófagos/microglía son críticas para la iniciación de la respuesta adquirida frente al TMEV (Olson y col., 2001). La expresión de este tipo de moléculas se induce como respuesta frente a estímulos pro-inflamatorios. Se utilizó como estímulo inflamatorio el LPS/IFN $\gamma$ , estímulo muy bien caracterizado y de amplio uso en la literatura. Como se esperaba, el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL y 100U/mL respectivamente) indujo la expresión de moléculas de MHC II en macrófagos activados. Experimentos encaminados a determinar la dosis apropiada de AEA mostraron que la dosis de 10 $\mu$ M era la más eficaz, mientras que la dosis de 1 $\mu$ M resultaba inefectiva y la de 5 $\mu$ M inducía cambios poco significativos. El tratamiento con AEA (10 $\mu$ M), así como con OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M), revirtió los efectos del estímulo pro-inflamatorio en la expresión de MHC II. Estos efectos fueron evidenciados tanto por una reducción de la inmunorreactividad contra los antígenos H-2A (Fig. 4a), como por una dis-

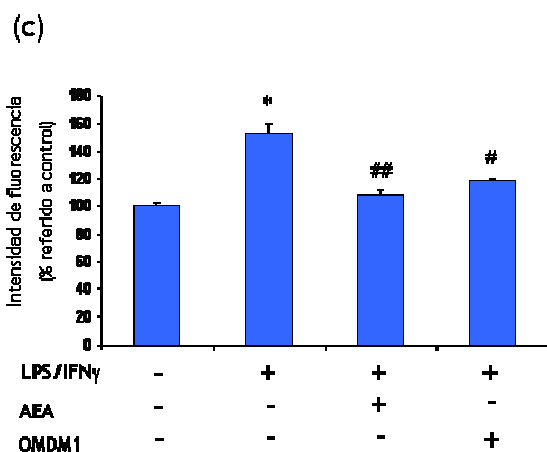
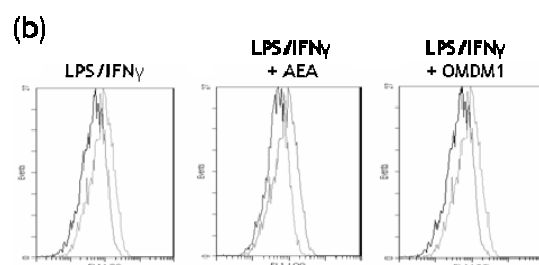
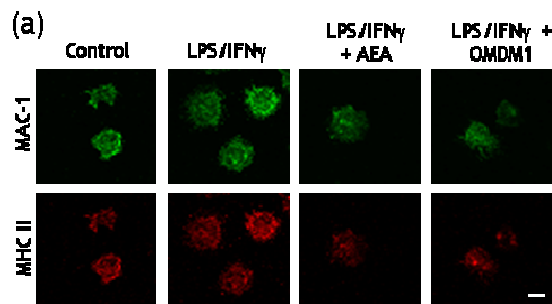
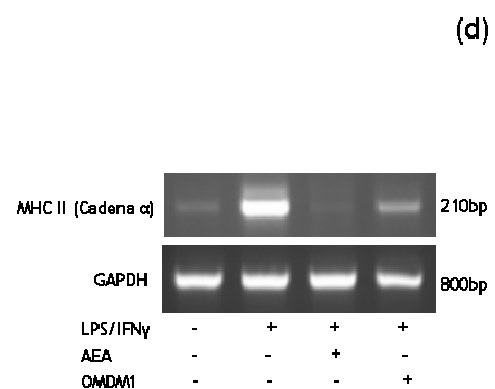


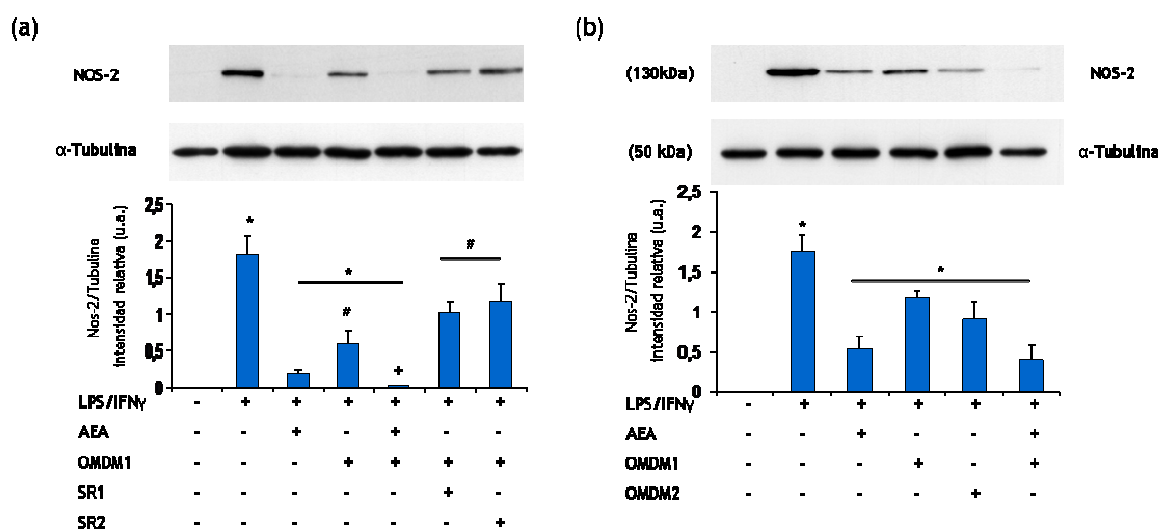
Figura 4: El tratamiento con AEA y con OMDM<sub>1</sub> disminuyen la expresión de moléculas de MHC II inducidas por LPS/IFN. (a) Microfotografía de inmunofluorescencia representativa de células CD11b<sup>+</sup> (verde) que muestra cómo el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) o con OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) reducen la expresión de MHC II (rojo). Barra de escala: 20 $\mu$ m. (b) Histogramas representativos generados por análisis por citometría de flujo de macrófagos con distintos tratamientos. (c) Cuantificación de la expresión de moléculas de MHC II por citometría de flujo después de los diferentes tratamientos, expresada como media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado. \*p<0,02 vs. Control; ##p<0,005 y #p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) El tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) o con OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) reduce la expresión del ARNm de la cadena  $\alpha$  de MHC II, determinada por RT-PCR.





minución de la intensidad de fluorescencia medida por citometría de flujo (Fig. 4b y 4c). Para confirmar estos efectos se realizó una RT-PCR de la cadena alfa de MHC II de cultivos primarios de microglía estimulados con LPS/IFN $\gamma$  y tratados con AEA o con OMDM<sub>1</sub>, observándose una reducción en la expresión del ARN mensajero de dicha cadena en ambos casos (Fig. 4d).

Otra molécula implicada en procesos inflamatorios y de daño por radicales libres es la enzima óxido nítrico sintasa-2 (NOS-2, del inglés “nitric oxide synthase-2”), cuya expresión aumenta marcadamente en respuesta a estímulos inflamatorios. Por ello se analizó la expresión de esta enzima por western blot en diferentes situaciones de estímulo y se procedió a cuantificar la intensidad de las bandas obtenidas por densitometría. Como puede observarse en la Fig. 5a, el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) redujo marcadamente la expresión de NOS-2 (\* $p$ <0,001). El compuesto OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M) fue también capaz de reducir la expresión de la enzima, pero en menor grado que AEA (\* $p$ <0,001). Cuando se coadministró el endocannabinoide junto con OMDM<sub>1</sub>, se observó una potenciación de los efectos de AEA (+ $p$ <0,001). A continuación se examinaron los efectos de los antagonistas de los receptores cannabinoides, a fin de determinar la participación de los mismos en los efectos observados tanto de AEA como de OMDM<sub>1</sub> sobre la expresión de NOS-2. Tanto el antagonista CB<sub>1</sub>, SR141716A (SR1), como el antagonista CB<sub>2</sub>, SR14528 (SR2), administrados am-



**Figura 5: OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> inhiben la expresión de la enzima inducible NOS-2 en macrófagos murinos tratados con LPS/IFN $\gamma$ .** (a) Western blot representativo de la expresión de NOS-2 en macrófagos sometidos a tratamientos con LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL y 100 UI/mL respectivamente), AEA (10 $\mu$ M), OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M), SR1 (1 $\mu$ M) y/o SR2 (1 $\mu$ M). Los datos densitométricos se representan como la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p$ <0,001 vs. Control o LPS/IFN $\gamma$ ; # $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA o LPS/IFN $\gamma$ +OMDM<sub>1</sub>; + $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA). (b) Western blot representativo de la expresión de NOS-2 en macrófagos tratados con AEA (10 $\mu$ M) y OMDM<sub>1</sub> u OADM<sub>2</sub> (5 $\mu$ M respectivamente). La densitometría representa la media  $\pm$  SEM de tres experimentos independientes realizados por triplicado (\* $p$ <0,0001 vs. Control; \* $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ ). Se utilizó la detección de  $\alpha$ -tubulina como control de carga y para normalizar los valores obtenidos por densitometría.

bos a una dosis de 1 $\mu$ M, fueron capaces de revertir los efectos de OMDM<sub>1</sub> sobre la expresión de NOS-2 (#p<0,05), lo cual indicaría que ambos receptores están involucrados en regulación de la expresión de esta enzima. Administrados por sí solos, estos compuestos no tuvieron ningún efecto.

Debido a que a altas dosis OMDM<sub>1</sub> puede interaccionar con los receptores cannabinoides (Ortar y col., 2003), se realizó el mismo experimento con una dosis menor a fin de descartar cualquier posibilidad de interacción con CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>. Utilizando la dosis de 5 $\mu$ M de OMDM<sub>1</sub>, inactiva sobre CB<sub>1</sub> o CB<sub>2</sub>, se obtuvieron resultados similares en cuanto a los efectos sobre la expresión de NOS-2 y una tendencia similar a potenciar los efectos de AEA (Fig. 5b).

Otros mediadores importantes del proceso inflamatorio y que juegan un papel importante en el establecimiento de la desmielinización inducida por TMEV son las citoquinas pro-inflamatorias TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-12 (revisado por Oleszak y col., 2004). Se decidió entonces evaluar el efecto de OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> sobre la producción de estas moléculas a partir de cultivos primarios de macrófagos/microglía. Como se observa en la Fig. 6, tanto AEA como OMDM<sub>1</sub> reducen la expresión del ARN mensajero de TNF- $\alpha$  y de IL-1 $\beta$ , determinado por RT-PCR en cultivos de microglía.

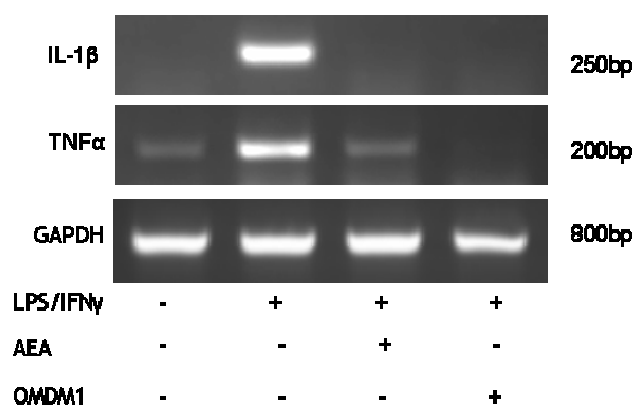
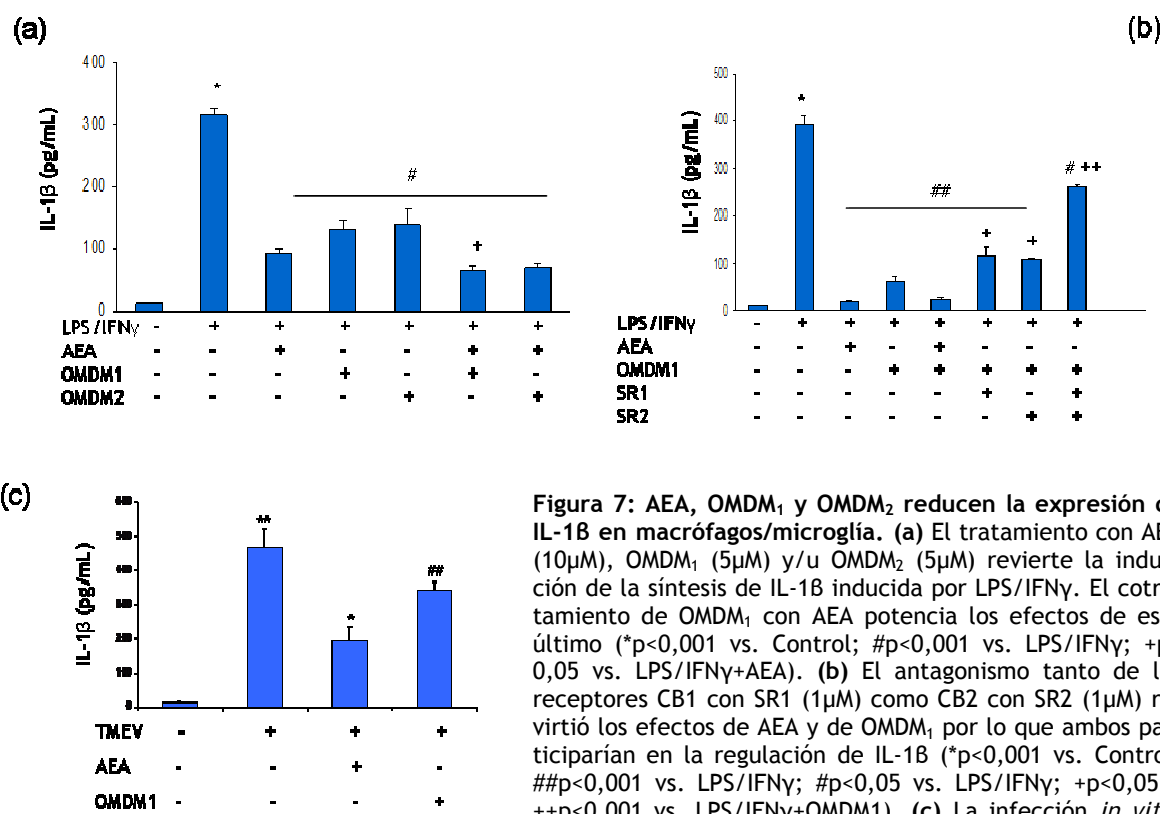


Figura 6: El tratamiento con AEA y con OMDM<sub>1</sub> inhiben la producción de citoquinas pro-inflamatorias. Tanto AEA (10 $\mu$ M) como OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) disminuyen la expresión de los ARN mensajeros de IL-1 $\beta$  y TNF $\alpha$  inducidos por el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  en células macrofágica/microgliales, determinada por RT-PCR.

Asimismo ambos compuestos son eficaces en reducir el aumento de expresión de IL-1 $\beta$  inducido por el estímulo pro-inflamatorio de LPS/IFN $\gamma$ . El OMDM<sub>2</sub> también mostró ser efectivo en reducir la expresión de IL-1 $\beta$  (Fig. 7a). Cuando se coincubó el endocannabinoide con OMDM<sub>1</sub> se observó una potenciación de los efectos de AEA (+p<0,05) (Fig. 7a). Este efecto estaría mediado principalmente por CB<sub>2</sub>, ya que cuando se antagoniza este receptor con SR2, se revierte la acción de OMDM<sub>1</sub>. En el caso del antagonismo con SR1, el efecto de reversión de los efectos de OMDM<sub>1</sub> fue mucho menor, aunque estadísticamente significativo, por lo que CB<sub>1</sub> también participaría en la regulación de la expresión de IL-1 $\beta$  (Fig. 7b). Como se demuestra más arriba, la infección *in vitro* de macrófagos con TMEV

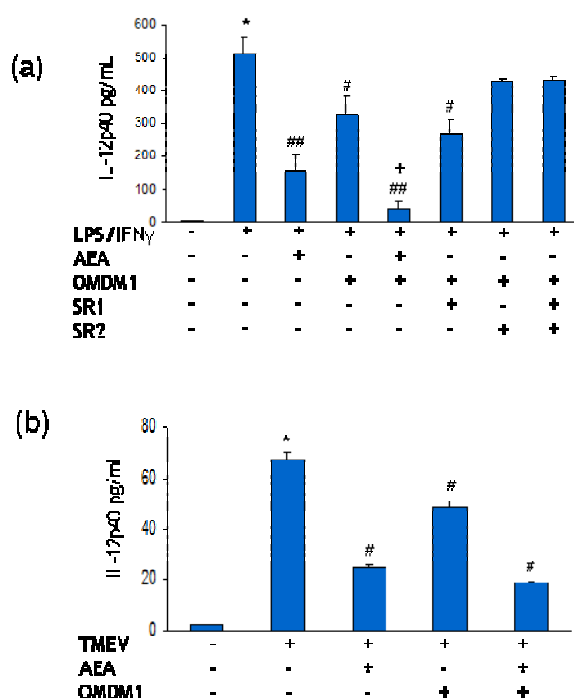


**Figura 7:** AEA, OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> reducen la expresión de IL-1 $\beta$  en macrófagos/microglía. (a) El tratamiento con AEA (10 $\mu$ M), OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) y/u OMDM<sub>2</sub> (5 $\mu$ M) revierte la inducción de la síntesis de IL-1 $\beta$  inducida por LPS/IFN $\gamma$ . El cotratamiento de OMDM<sub>1</sub> con AEA potencia los efectos de este último (\* $p$ <0,001 vs. Control; # $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA). (b) El antagonismo tanto de los receptores CB1 con SR1 (1 $\mu$ M) como CB2 con SR2 (1 $\mu$ M) revirtió los efectos de AEA y de OMDM<sub>1</sub> por lo que ambos participarían en la regulación de IL-1 $\beta$  (\* $p$ <0,001 vs. Control; ## $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; # $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p$ <0,05 y ++ $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ +OMDM<sub>1</sub>). (c) La infección *in vitro*

con el virus de Theiler (MOI de 5 ufp por célula) produce un aumento en los niveles de IL-1 $\beta$  determinado en el sobrenadante de cultivos de células macrófago/microgliales por ELISA. Dicho efecto es revertido por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) u OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M) (\*\* $p$ <0,0001 vs. Control; \* $p$ <0,001 vs. TMEV; ## $p$ <0,05 vs. TMEV).

produjo un incremento en los niveles de AEA. Repitiendo las mismas condiciones de infección antes descritas, se procedió a determinar los niveles de IL-1 $\beta$ , observándose un elevado aumento con el caso de la infección con TMEV, el cuál era revertido por el tratamiento con AEA y en menor grado con OMDM<sub>1</sub> (Fig. 7c).

Finalmente se procedió a determinar el efecto de estos compuestos sobre la producción de IL-12. Esta citoquina heterodimérica cumple un papel fundamental en la activación linfocitaria y en el establecimiento de la respuesta inmune de tipo Th1 (Hsieh y col., 1993). Está formada por las subunidades p35 y p40, siendo esta última la limitante a la hora de formar la citoquina biológicamente activa. Por esto se decidió analizar el efecto de AEA y OMDM<sub>1</sub> en la producción de IL-12p40 en macrófagos estimulados con LPS/IFN $\gamma$ . Como se muestra en la Fig. 8a, el estímulo con LPS/IFN $\gamma$  indujo un marcado aumento en la síntesis de esta citoquina. El tratamiento tanto con AEA (10 $\mu$ M) como con OMDM<sub>1</sub> (5 $\mu$ M) redujo los niveles de IL-12p40, aunque en el caso de OMDM<sub>1</sub> el efecto fue menor. El tratamiento combinado AEA/OMDM<sub>1</sub> tuvo un importante efecto sinérgico (+ $p$ <0,001) en la disminución de la expresión de IL-12p40. Para examinar la participación de los receptores cannabinoides se utilizaron antagonistas específicos de los mismos. El efecto inhibitorio de OMDM<sub>1</sub> fue parcialmente revertido por SR2 (1 $\mu$ M), mientras que SR1 (1 $\mu$ M) careció de



**Figura 8: Efecto de AEA y OMDM<sub>1</sub> sobre la expresión de IL-12p40 en células macrófago/microgliales.** (a) El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento en la síntesis de IL-12p40, el cual es revertido por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) y/u OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M). Este efecto es parcialmente mediado por los receptores CB1 y CB2, ya que su bloqueo con los antagonistas específicos SR1 (1 $\mu$ M) y/o SR2 (1 $\mu$ M) revierte las acciones de AEA y OMDM<sub>1</sub> sobre IL-12p40 (\* $p$ <0,001 vs. Control; ## $p$ <0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; # $p$ <0,003 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA). (b) La infección *in vitro* con el virus de Theiler (MOI 5 ufp por célula) induce un aumento en la síntesis de IL-12p40, determinado en los sobrenadantes de cultivos de células macrófago/microgliales por ELISA. Dicho aumento es revertido por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) u OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M). La coadministración de ambos compuestos mostró una tendencia a potenciar los efectos de AEA, pero sin alcanzar una significación estadística (\* $p$ <0,001 vs. Control; # $p$ <0,001 vs. TMEV).

efectos sobre esta citoquina (Fig 8a). Para confirmar la importancia de IL-12 en la respuesta inmune frente a al TMEV, se realizaron infecciones *in vitro* de cultivos primarios de macrófagos, en presencia o ausencia de AEA o de OMDM<sub>1</sub>. Como se muestra en la figura 8b, las células infectadas con TMEV producen grandes cantidades de IL-12p40 (\* $p$ <0,001), mientras que con el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) se redujo significativamente dicho aumento (# $p$ <0,001). El tratamiento con OMDM<sub>1</sub> (10 $\mu$ M) también disminuyó los niveles de IL-12p40, aunque en menor grado (Fig. 8b).

Los resultados obtenidos tanto en las pruebas comportamentales, la histología así como en la determinación *in vitro* de mediadores pro-inflamatorios indican que el aumento del tono cannabinoide endógeno (mediante el uso de inhibidores de la recaptación de AEA) pueden jugar un papel importante en la modulación de la respuesta inflamatoria que pueden estar involucradas en los déficit motores presentes en este modelo de esclerosis múltiple.

**2. Efecto de la administración *in vivo* de AEA, metanandamida (Met-AEA) y del inhibidor de la FAAH, el araquidonoil-serotonina (AA-5HT) en el modelo de Theiler.**



Los resultados antes expuestos mostraron que la manipulación del tono endógeno cannabinoide, mediante la administración de inhibidores de la recaptación de AEA, modulaban la respuesta inflamatoria en el modelo de Theiler. Para confirmar la participación del sistema endocannabinoide en la regulación del proceso inflamatorio se utilizaron tres aproximaciones: la administración de AEA durante 7 días mediante bombas osmóticas (3,5 mg/ $\mu$ L; Q = 1 $\mu$ L/hora), la administración intraperitoneal de Met-AEA (2,5 mg/kg durante los primeros 6 días y 3,75 mg/kg durante los últimos 6 días) y la administración intraperitoneal de AA-5HT (inhibidor de FAAH) durante 10 días (5 mg/kg). Al término del protocolo de tratamiento, los animales fueron sacrificados y sus médulas espinales extraídas para el análisis de moléculas involucradas en la respuesta inmuno-inflamatoria en el modelos de TMEV-IDD.

En dicho contexto es interesante destacar el papel fundamental que cumplen las citoquinas de la familia de IL-12 (IL-12p70, IL-23 e IL-27) en el establecimiento de una respuesta linfocitaria de tipo Th1 (Chehimi y col., 1993; Lankford y Frutch, 2003; Trinchieri, 2003). Asimismo varios estudios sugieren que la producción de estas citoquinas está aumentada en procesos inflamatorios crónicos y en patologías autoinmunes, como la artritis inducida por colágeno (McIntyre y col., 1996; Matthys y col., 1998; Murphy y col., 2003), la diabetes autoinmune (Trembleau y col., 2003), la enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Schmidt y col., 2005) y la fase efectora de la encefalomiелitis autoinmune experimental, un modelo agudo de esclerosis múltiple (Becher y col., 2002; Cua y col., 2003). Por estos antecedentes, se decidió centrar el estudio en el efecto de la administración de AEA y de 5HT-AA sobre la expresión de IL-12 (heterodímero p35/p40) e IL-23 (heterodímero p19/p40) en el modelo de Theiler.

## **2.1 Patrón bifásico del curso temporal de expresión de las subunidades p35, p40 y p19 en la médula espinal en el modelos de TMEV-IDD.**

Como primera aproximación al estudio de los efectos de la modulación de los endocannabinoides sobre la expresión de IL-12 y de IL-23 se determinó si la expresión de las subunidades que conforman esta citoquinas se hallaba aumentada en la médula espinal de ratones infectados. Para ello se analizaron médulas obtenidas de ratones “sham” y obtenidas de ratones infectados con TMEV a 45 días post-infección. Mediante RT-PCR se analizaron los niveles del ARN mensajero de p35, p40 y p19, encontrándose en todos los casos un aumento en la expresión de estas subunidades en los ratones infectados a 45 días post-infección (Fig. 9). A continuación, y para establecer el patrón de expresión de estas subunidades, se realizó un curso temporal de la expresión de las mismas en la médula espinal

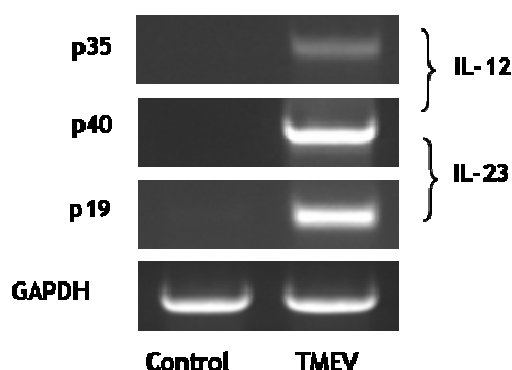


Figura 9: La infección *in vivo* con el virus de Theiler induce un aumento en los niveles de las subunidades de IL-12 e IL-23. La infección *in vivo* de ratones con TMEV induce un aumento en la expresión del ARN mensajero de p35, p40 y p19 en la médula espinal de los mismos, determinado por RT-PCR.

de ratones infectados con TMEV. Para ello se sacrificaron ratones a distintos tiempos post-infección y se obtuvieron las médulas espinales de las cuales se extrajo el ARN y mediante PCR cuantitativa se analizaron los niveles de las subunidades p35, p19 y p40. Como se observa en la Fig. 10 las tres subunidades presentan un patrón de expresión bifásico, con aumentos a los 35 y a los 90 días post-infección y una disminución de los niveles de ARN mensajero a los 60 días (menos marcada en el caso de p40). En el caso de p19 (Fig. 10b), el aumento es más acusado a los 90 días. Cabe destacar que en los animales control (“sham”) la expresión de p40 fue indetectable a todos los tiempos (Fig. 10c), dato que está de acuerdo con la literatura, en cuanto que la expresión de esta subunidad se encuentra fuertemente reprimida en condiciones basales (Trinchieri, 2003).

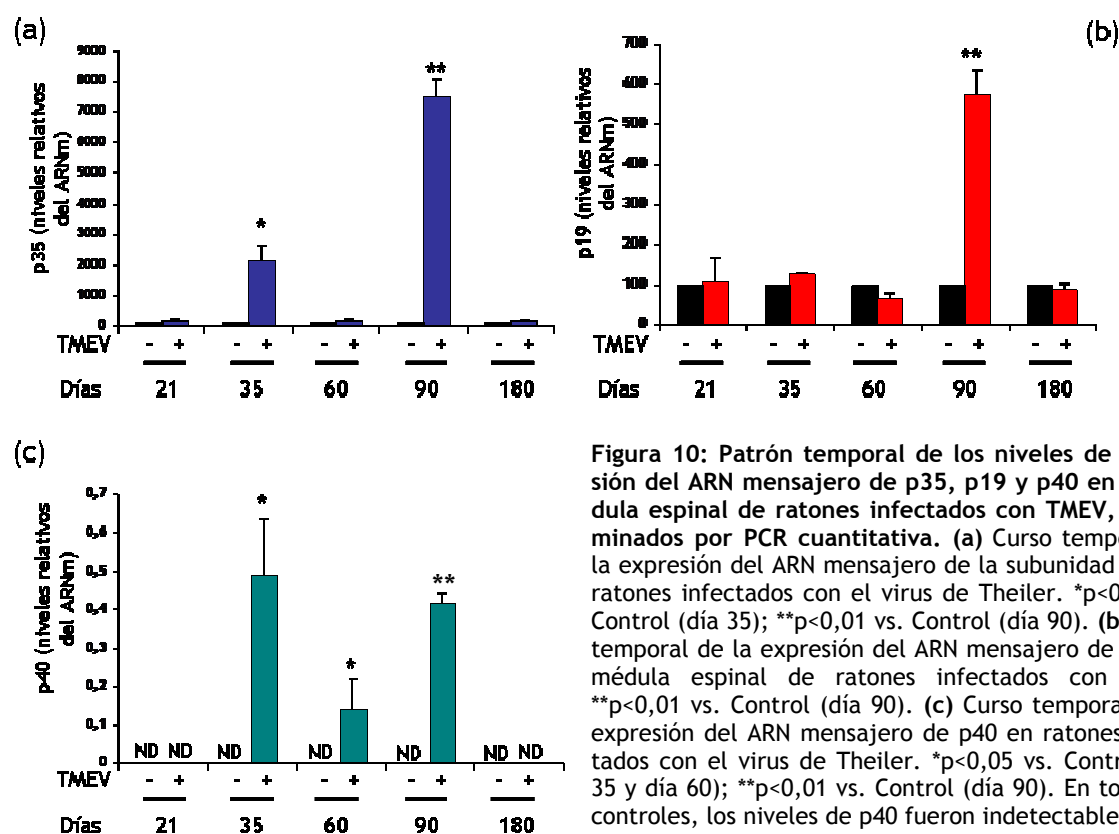


Figura 10: Patrón temporal de los niveles de expresión del ARN mensajero de p35, p19 y p40 en la médula espinal de ratones infectados con TMEV, determinados por PCR cuantitativa. (a) Curso temporal de la expresión del ARN mensajero de la subunidad p35 en ratones infectados con el virus de Theiler. \* $p < 0,05$  vs. Control (día 35); \*\* $p < 0,01$  vs. Control (día 90). (b) Curso temporal de la expresión del ARN mensajero de p19 en médula espinal de ratones infectados con TMEV. \*\* $p < 0,01$  vs. Control (día 90). (c) Curso temporal de la expresión del ARN mensajero de p40 en ratones infectados con el virus de Theiler. \* $p < 0,05$  vs. Control (día 35 y día 60); \*\* $p < 0,01$  vs. Control (día 90). En todos los controles, los niveles de p40 fueron indetectables (ND).



A los 21 días post-infección es cuando se comienzan a detectar antígenos virales del TMEV en la médula espinal y a producir la respuesta inmune contra el virus (revisado por Oleszak y col., 2004). Sin embargo, es a los 35 días post-infección cuando hay un mayor número de antígenos virales en la médula espinal. Este hecho explicaría el aumento en la expresión de p35, p40 y ligeramente de p19 observado a los 35 días post-infección. Conforme se cronifica la infección, se produce el fenómeno de expansión de epítomos (Miller y col., 1997) y se asocia a la inflamación crónica una respuesta autoinmune frente a los antígenos de la mielina (Katz-Levy y col., 2000) entre los 80-100 días post-infección, lo cual explicaría el aumento de la expresión de las tres subunidades, en particular de p19, a los 90 días post-infección. De manera que se establecen oleadas de respuestas frente a antígenos virales primero y posteriormente a antígenos de mielina, lo que explicaría el patrón de expresión de estas citoquinas.

## **2.2 El tratamiento subcrónico con AEA, con Met-AEA o con AA-5HT reduce la expresión de los ARN mensajeros de las subunidades p35, p19 y p40 a los 90 días post-infección.**

Una vez establecido el patrón de expresión del ARN mensajero de las subunidades de IL-12 e IL-23, se decidió estudiar el efecto del tratamiento con AEA o con el inhibidor de FAAH, 5HT-AA a los 90 días post-infección, dado que a este tiempo se observaba el mayor aumento en la expresión de las tres subunidades.

En el caso del tratamiento con AEA, a los 83 días post-infección un grupo de ratones fueron implantados con bombas osmóticas como se describe en Materiales y Métodos. Estas bombas liberaban en forma continua (a razón de 1  $\mu$ L/hora) durante 7 días una solución de AEA (3,5  $\mu$ g/ $\mu$ L) o vehículo, según el caso, de tal manera que al cabo del tratamiento los animales cumplieran los 90 días post-infección. Se realizaron pruebas conductuales motoras utilizando el actímetro y el rotarod antes de la cirugía y a los tres días de implantadas las bombas para descartar cualquier efecto debido a la administración del cannabinoide sobre la respuesta motora, no encontrándose diferencias entre el grupo vehículo y el grupo tratado con AEA. Una vez finalizado el protocolo de administración se sacrificaron los animales y se extrajeron las médulas espinales para analizar la expresión del ARN mensajero de las subunidades de IL-12 e IL-23. Como se observa en la Fig. 11, la administración subcrónica de AEA redujo marcadamente la expresión del mensajero de p35 (Fig. 11a) y p19 (Fig. 11b). En el caso de p40 la reducción fue modesta aunque estadísticamente significativa (Fig. 11c).

Dada la labilidad de la molécula de AEA (Devane y col., 1992; Di Marzo y col.,

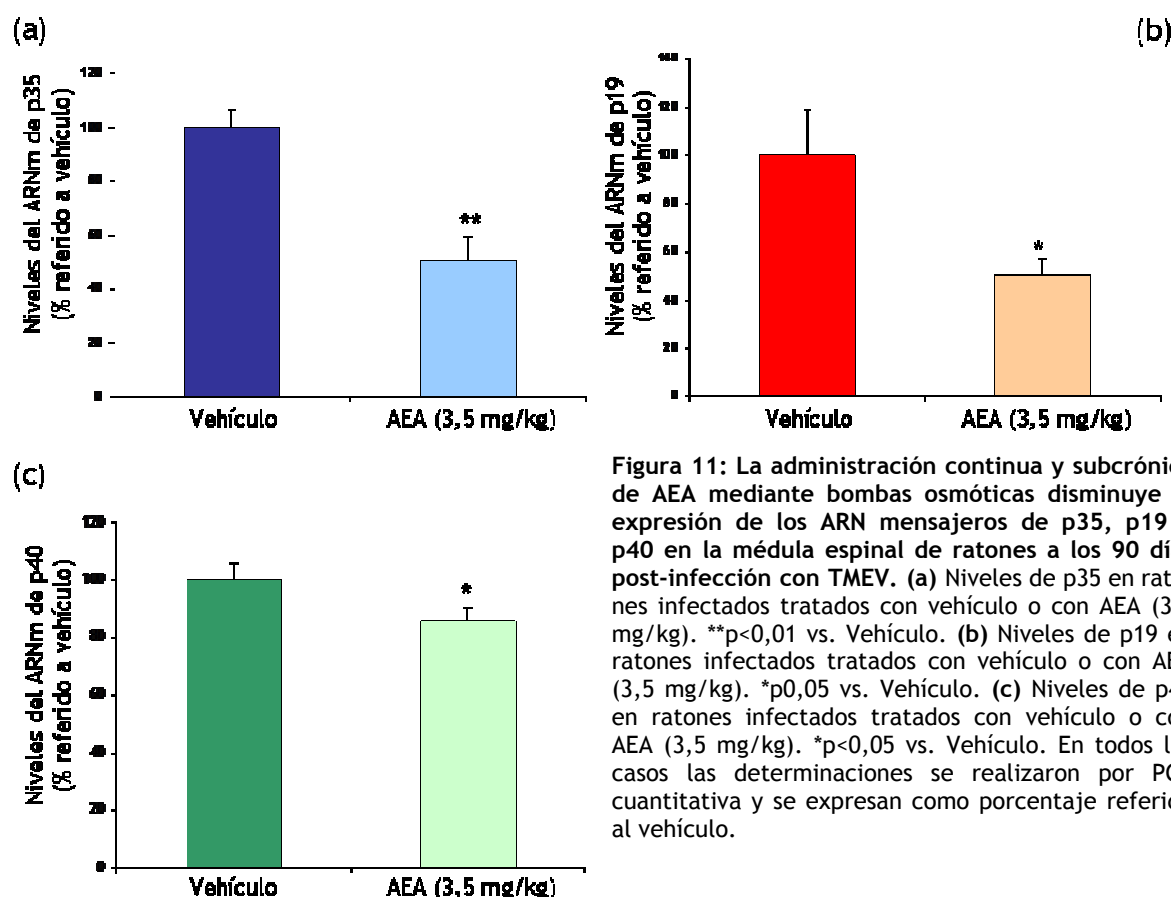
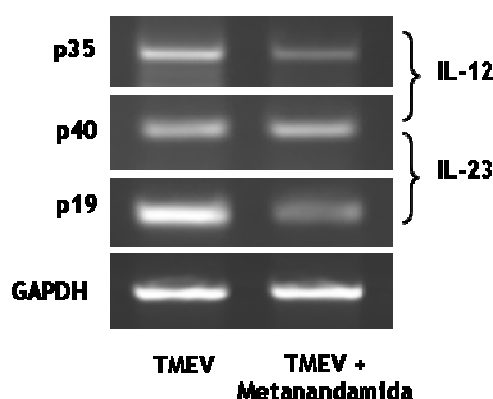


Figura 11: La administración continua y subcrónica de AEA mediante bombas osmóticas disminuye la expresión de los ARN mensajeros de p35, p19 y p40 en la médula espinal de ratones a los 90 días post-infección con TMEV. (a) Niveles de p35 en ratones infectados tratados con vehículo o con AEA (3,5 mg/kg). \*\* $p < 0,01$  vs. Vehículo. (b) Niveles de p19 en ratones infectados tratados con vehículo o con AEA (3,5 mg/kg). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. (c) Niveles de p40 en ratones infectados tratados con vehículo o con AEA (3,5 mg/kg). \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. En todos los casos las determinaciones se realizaron por PCR cuantitativa y se expresan como porcentaje referido al vehículo.

1999), se decidió realizar estudios con Met-AEA, un análogo de AEA metabólicamente estable. Por lo tanto, este compuesto posee una mayor vida media que AEA al no ser degradado por la enzima FAAH. Esta vez se siguió un protocolo de administración que consistía en la inyección intraperitoneal durante los primeros 6 días del tratamiento (que correspondía a los setenta y ocho días post-infección) de una solución de 2,5 mg/kg de Met-AEA para luego elevar la dosis los últimos 6 días del tratamiento (que corresponde a los ochenta y cuatro días post-infección) a 3,75 mg/kg. La razón del aumento de la dosis administrada a la mitad del tratamiento fue para evitar que los ratones desarrollaran tolerancia. Al cabo de los 12 días de tratamiento, los animales fueron sacrificados y se obtuvieron las médulas espinales para analizar la expresión de las subunidades por RT-PCR. Como se ob-

Figura 12: Expresión del ARN mensajero de p35, p40 y p19 en la médula espinal de ratones infectados con TMEV y tratados con metanandamida. El tratamiento con Met-AEA reduce los niveles de expresión de p35 y p19 en la médula espinal de ratones a los 90 días post-infección con TMEV, mientras que no parece modificar los niveles de p40.



serva en la Fig. 12, los niveles del mensajero de p35 y p19 están disminuidos en los animales tratados con Met-AEA con respecto a los animales tratados con vehículo, mientras que los niveles de p40 no parecen estar modificados. El hecho de que Met-AEA no sea capaz de revertir los efectos de la infección viral sobre la expresión de p40 podría estar debido a la escasa afinidad de este compuesto por el receptor CB<sub>2</sub>, el cual, teniendo en cuenta los datos anteriormente presentados, parecería estar más involucrado en la regulación de estas citoquinas que el receptor CB<sub>1</sub>.

La tercera estrategia consistió en la administración de AA-5HT, un inhibidor de la FAAH, la enzima hidrolítica más importante en la vía de degradación de la AEA (Soria-Gómez y col., 2007). De esta manera, al eliminar la principal vía catabólica aumentan los niveles endógenos de AEA. Se siguió un protocolo de administración intraperitoneal de AA-5HT (5 mg/kg) durante 10 días, al cabo del cual se sacrificaron los animales con el fin de extraer las médulas espinales para analizar la expresión de p35, p40 y p19 por PCR cuantitativa. Se realizaron pruebas conductuales antes y a mitad del tratamiento para comprobar si el aumento de los niveles de AEA no ocasionaba las alteraciones motoras típicas de los cannabinoides, no observándose ninguna diferencia entre los distintos grupos. La Fig. 13 muestra que los animales tratados con AA-5HT presentaban niveles más bajos de los mensajeros de p35 (Fig. 13a), p19 (Fig. 13b) y lo que es más interesante, de p40 (Fig. 13c) que los animales tratados con vehículo.

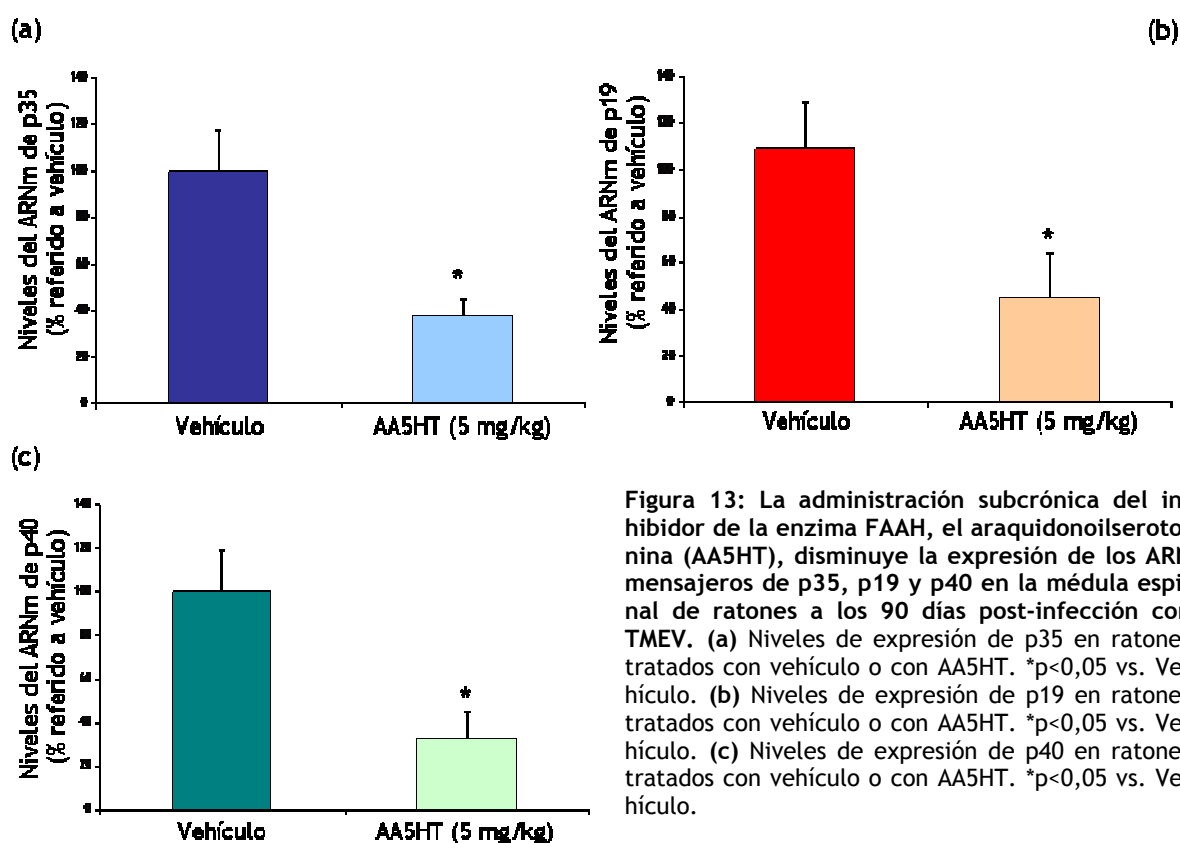


Figura 13: La administración subcrónica del inhibidor de la enzima FAAH, el araquidonoilserotonina (AA5HT), disminuye la expresión de los ARN mensajeros de p35, p19 y p40 en la médula espinal de ratones a los 90 días post-infección con TMEV. (a) Niveles de expresión de p35 en ratones tratados con vehículo o con AA5HT. \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. (b) Niveles de expresión de p19 en ratones tratados con vehículo o con AA5HT. \* $p < 0,05$  vs. Vehículo. (c) Niveles de expresión de p40 en ratones tratados con vehículo o con AA5HT. \* $p < 0,05$  vs. Vehículo.

La manipulación del sistema endocannabinoide mediante diferentes estrategias, como la administración directa de AEA, de un análogo no hidrolizable o la inhibición de la enzima FAAH, produjo una modulación a la baja de las subunidades de IL-12 e IL-23, dos citoquinas sumamente importantes en el establecimiento de una respuesta inmune de tipo celular y cuya sobreproducción se ha visto implicada en el establecimiento de procesos autoinmunes e inflamatorios crónicos. Sin embargo poco se sabe de los mecanismos moleculares por los cuales AEA podría estar actuando para regular la expresión de estas interleuquinas pro-inflamatorias. Por lo tanto, el siguiente paso que nos planteamos fue estudiar cuáles son los mecanismos moleculares utilizados por AEA para producir sus efectos sobre estas proteínas.

### **3. Mecanismos moleculares implicados en la regulación de IL-12 e IL-23 por AEA.**



Varios estudios demuestran la capacidad de los cannabinoides de modular la activación de células macrofágico/microgliales. Así, el  $\Delta^9$ -THC, el principal componente psicoactivo de la marihuana, inhibe la proliferación de las células murinas P388D1 (Tang y col., 1992) y reduce la cantidad de TNF- $\alpha$  y de óxido nítrico producida por la línea celular de ratón RAW264.7 en respuesta al LPS (Jeon y col., 1996). Además, se ha descrito que tanto THC como AEA inhiben la muerte celular en la línea celular de fibroblastos L929 sensibles a TNF- $\alpha$  mediada por macrófagos peritoneales (Devane y col., 1992; Cabral y col., 1995). Estos y otros estudios demuestran la capacidad de los cannabinoides en modular distintos aspectos de la activación de células de la estirpe macrofágico/microglial. Sin embargo, los mecanismos por el cual estos compuestos ejercen sus efectos moduladores necesitan ser definidos, ya que se han propuesto tanto mecanismos mediados por receptor cannabinoide como independientes de los mismos (Felder y col., 1992; Berdyshev y col., 2001).

### 3.1 AEA limita la producción en microglía de IL-12 e IL-23 (y sus subunidades) en respuesta al TMEV y a LPS/IFN $\gamma$ .

Dado el papel central que juega la microglía como efector de la respuesta inmune innata y como células accesorias de la inmunidad adquirida (Aloisi y col., 1998) junto con la capacidad de los cannabinoides de modular el proceso inflamatorio (Klein y col., 2003), se decidió evaluar el efecto de AEA sobre la producción de IL-12 e IL-23 en microglía frente a los estímulos pro-inflamatorios de TMEV y LPS/IFN $\gamma$ .

Tanto la infección *in vitro* con TMEV (Fig. 14a) como el estímulo con LPS/IFN $\gamma$  (Fig. 14b) produjeron un aumento en la expresión del ARN mensajero de las subunidades p35, p40 y p19 en cultivos primarios de microglía. En ambos casos el co-tratamiento con AEA

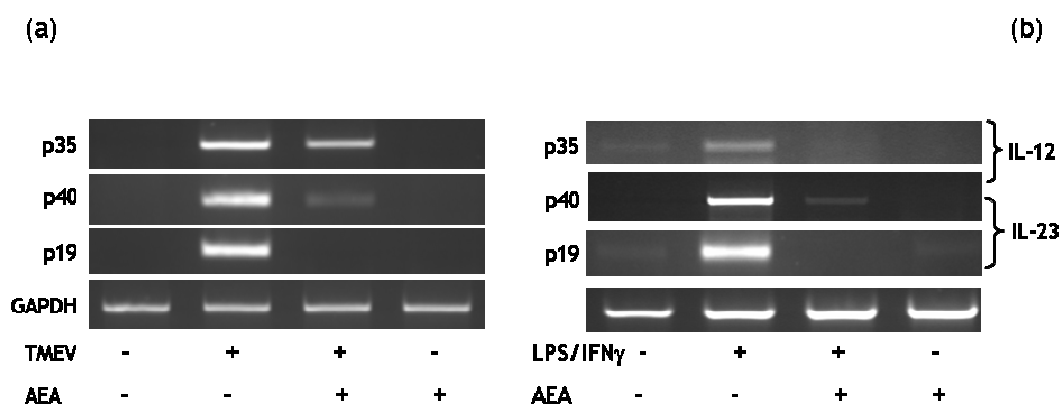


Figura 14: Comparación entre los efectos de la infección *in vitro* con el virus de Theiler y el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$ . (a) Como se mostró anteriormente, la infección *in vitro* con TMEV aumenta la expresión de los ARN mensajeros de las subunidades que conforman IL-12 e IL-23. (b) El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) aumenta los niveles de los ARN mensajeros de p35, p40 y p19. EN ambos casos, el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) reduce dicho aumento.

(10 $\mu$ M) revirtió la inducción de las tres subunidades.

Habiendo establecido que la microglía responde a diversos estímulos inflamatorios mediante un aumento en la expresión de las subunidades que conforman las citoquinas biológicamente activas IL-12 e IL-23, se decidió evaluar la posible participación de los receptores cannabinoides. Para ello se realizaron los distintos tratamientos (TMEV, LPS/IFN $\gamma$ ) en presencia o ausencia de los antagonistas CB<sub>1</sub> (SR1) y CB<sub>2</sub> (SR2). Como se observa en la Fig. 15, en ambos casos el antagonismo del receptor CB<sub>1</sub> no fue capaz de revertir los efectos de AEA, mientras que sí hubo una reversión, aunque parcial, cuando se antagonizó el receptor CB<sub>2</sub>. El tratamiento combinado con ambos antagonistas de receptores cannabinoides no produjo sinergismo en sus efectos sobre la reversión del efecto de AEA. Estos

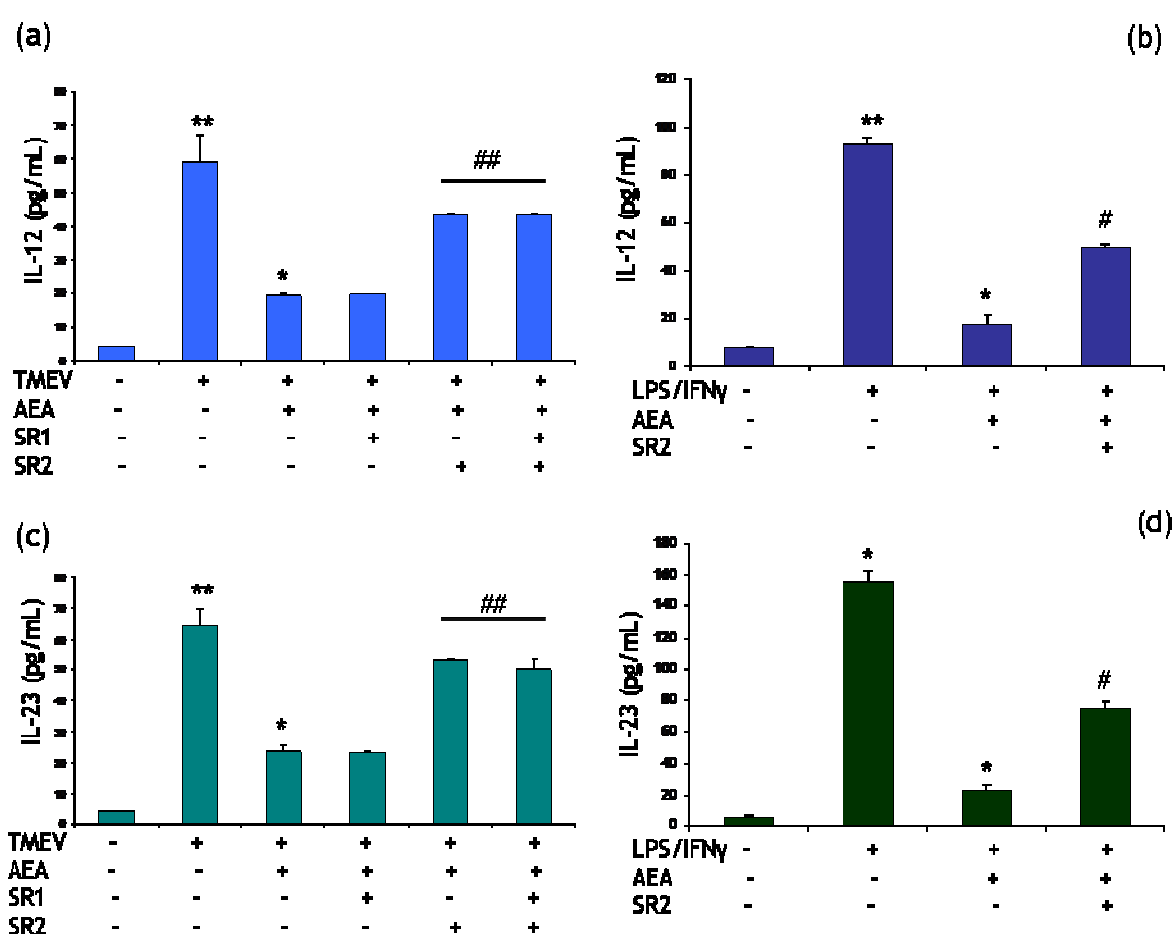


Figura 15: Participación del receptor CB<sub>2</sub> en los efectos de AEA sobre la regulación de la expresión de IL-12 e IL-23. (a) La infección *in vitro* de cultivos de microglía induce un aumento en la expresión de la citoquina IL-12, el cual es modulado a la baja por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M). El antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M) revierte los efectos de AEA. \*\*p<0,005 vs. Control; \*p<0,05 vs. TMEV; ##p<0,01 vs. TMEV+AEA. (b) El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  produce un aumento en la expresión de IL-12, el cual es revertido por AEA mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub>. \*\*p<0,005 vs. Control; \*p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA. (c) La infección *in vitro* de cultivos de microglía induce un aumento en la expresión de la citoquina IL-23, el cual es modulado a la baja por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M). El antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M) revierte los efectos de AEA. \*\*p<0,005 vs. Control; \*p<0,05 vs. TMEV; ##p<0,01 vs. TMEV+AEA. (d) El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  produce un aumento en la expresión de IL-23, el cual es revertido por AEA mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub>. \*\*p<0,005 vs. Control; \*p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA.



datos sugieren que el receptor que está más implicado en la mediación de los efectos de AEA sobre la expresión de IL-12 e IL-23 sería el CB<sub>2</sub>.

De especial interés es conocer si la microglía humana es también sensible a los efectos de AEA. Dado que la microglía humana responde a los estímulos nocivos produciendo citoquinas pro-inflamatorias, en particular IL-12 (Taoufik y col., 2001) e IL-23 (Vaknin-Dembinsky y col., 2006; Li y col., 2007) y que expresa receptores CB<sub>2</sub> en ciertas condiciones patológicas como enfermedad de Alzheimer, infección con VHI y EM (Núñez y col., 2004; Benito y col., 2007), se evaluó si la administración de AEA podría regular la expresión tanto de las subunidades como de las citoquinas biológicamente activas, inducidas por el estímulo con LPS/IFN $\gamma$ . Como se muestra en la Fig. 16, el estímulo con LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento en expresión del ARN mensajero las subunidades p35 (Fig. 16a), p40 (Fig. 16b), p19 (Fig. 16c), determinada por PCR cuantitativa. El tratamiento con AEA

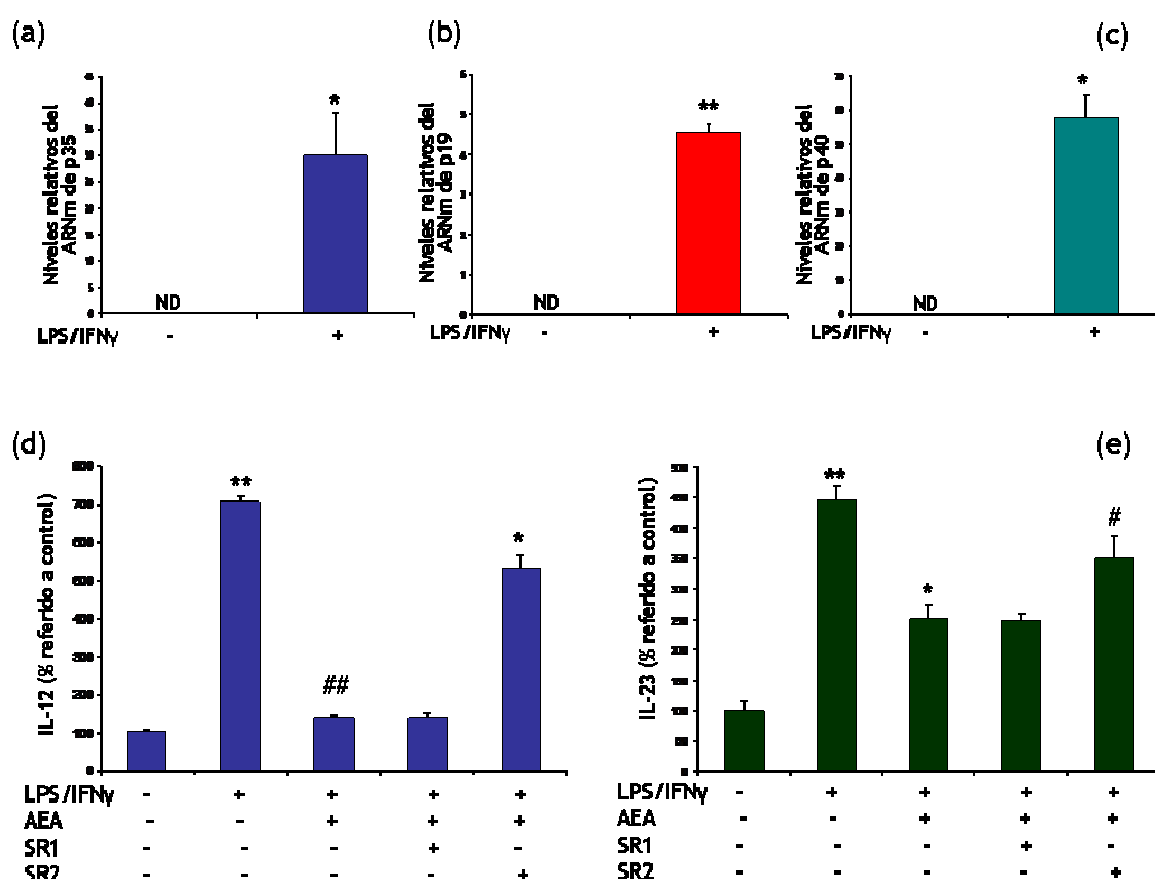


Figura 16: AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23 en cultivos de microglía humana. Participación del receptor CB<sub>2</sub>. (a) El tratamiento de microglía humana con LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento en la expresión del mensajero de p35, determinado por PCR cuantitativa. \* $p < 0,05$  vs. Control. (b) El tratamiento de microglía humana con LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento en la expresión del mensajero de p19, determinado por PCR cuantitativa. \* $p < 0,05$  vs. Control. (c) El tratamiento de microglía humana con LPS/IFN $\gamma$  induce un aumento en la expresión del mensajero de p40, determinado por PCR cuantitativa. \* $p < 0,05$  vs. Control. (d) AEA (10 $\mu$ M) revierte el aumento de IL-12 inducido por LPS/IFN $\gamma$ . Dicho efecto se pierde parcialmente al antagonizar el receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M). \*\* $p < 0,001$  vs. Control; ## $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \* $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA. (e) El tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) revierte el aumento de IL-23 inducido por LPS/IFN $\gamma$ . Dicho efecto se pierde parcialmente al antagonizar el receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M). \*\* $p < 0,001$  vs. Control; \* $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; # $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA.

(10 $\mu$ M) disminuye la expresión proteica de IL-12 (Fig. 16d) e IL-23 (Fig. 16e), determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de microglía humana, efecto que es mediado por el receptor CB<sub>2</sub>. El antagonismo del mismo con SR2 (1 $\mu$ M) revierte los efectos de AEA sobre la expresión de IL-12 e IL-23 (Fig. 12d y 12e).

### 3.2 El agonista selectivo CB<sub>2</sub> JWH-133 regula negativamente la expresión de IL-12p40.

A fin de confirmar la participación del receptor CB<sub>2</sub> en la regulación de la expresión de estas interleuquinas heterodiméricas se utilizó el agonista sintético selectivo de CB<sub>2</sub>, el JWH-133. Además se decidió evaluar la regulación de la subunidad p40 (IL-12p40) común a IL-12 e IL-23, como una medida indirecta de ambas citoquinas.

Como primer paso se realizó una curva dosis-respuesta de JWH-133 determinando en el sobrenadante de cultivos primarios de macrófagos los niveles de IL-12p40. La Fig.17a muestra como JWH-133 inhibe la producción de IL-12p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$  en una forma dosis-dependiente, aunque la dosis de 5 $\mu$ M (la mayor concentración usada) fue menos efectiva que la dosis de 100nM, lo que sugiere un comportamiento farmacológico de “U”. La Fig. 17b muestra que el efecto de JWH-133 (100nM) sobre la producción de IL-12p40 fue significativamente revertido por el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2. Cabe destacar que la aplicación por sí sola del antagonista no tuvo ningún efecto sobre la producción de IL-12p40.

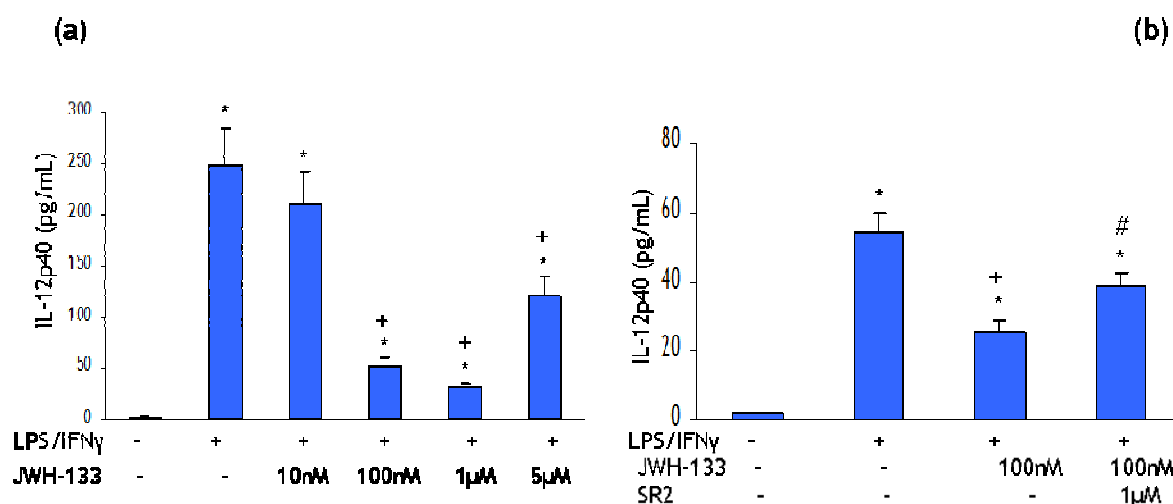
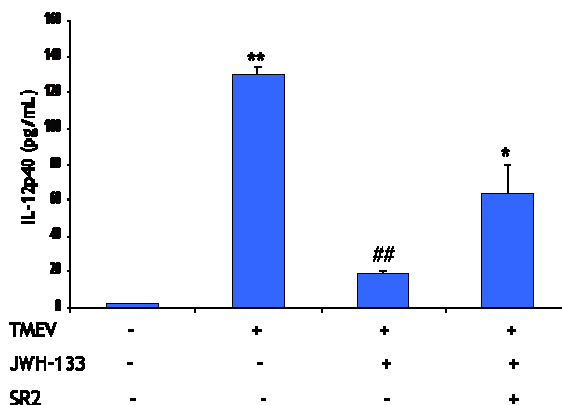


Figura 17: Efecto del agonista específico CB<sub>2</sub>, JWH-133, sobre la expresión de IL-12p40. (a) Dosis-respuesta en forma de “U” de JWH-133 (de 10nM a 5 $\mu$ M) sobre la expresión de IL-12p40 inducida por el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL y 100 UI/mL respectivamente). \* $p < 0,005$  vs. Control; + $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) El antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M) revierte los efectos de JWH-133 sobre la síntesis de IL-12p40 determinado en los sobrenadantes de los cultivos. \* $p < 0,01$  vs. Control; + $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; # $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ +JWH-133.

De igual manera, la infección *in vitro* de macrófagos con TMEV indujo la síntesis

proteica de la subunidad p40 y el tratamiento con JWH-133 redujo significativamente esta inducción. Otra vez, el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> revirtió, al menos parcialmente, los efectos de JWH-133 (Fig. 18).

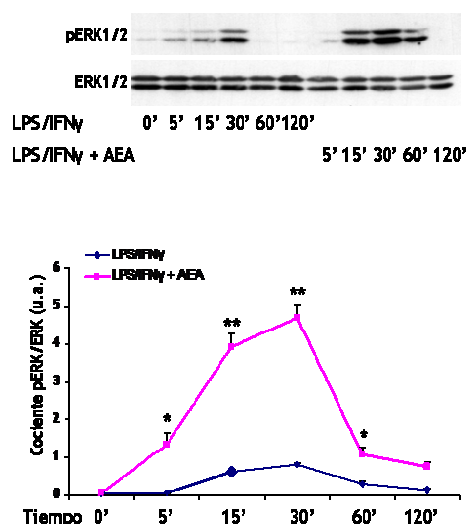
**Figura 18:** Participación del receptor CB<sub>2</sub> en los efectos de JWH-133 sobre la producción de IL-12p40. La infección *in vitro* de cultivo de macrófagos produjo un aumento en la producción de IL-12p40, la cual fue revertida por el tratamiento con JWH-133 (100nM). El antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1μM) revirtió los efectos del agonista específico JWH-133. \*\*p<0,005 vs. Control; ##p<0,01 vs. TMEV; \*p<0,05 vs. TMEV+JWH-133.



### 3.3 AEA regula de manera diferencial la expresión de IL-12 y de IL-23: participación de las vías de ERK1/2 y JNK.

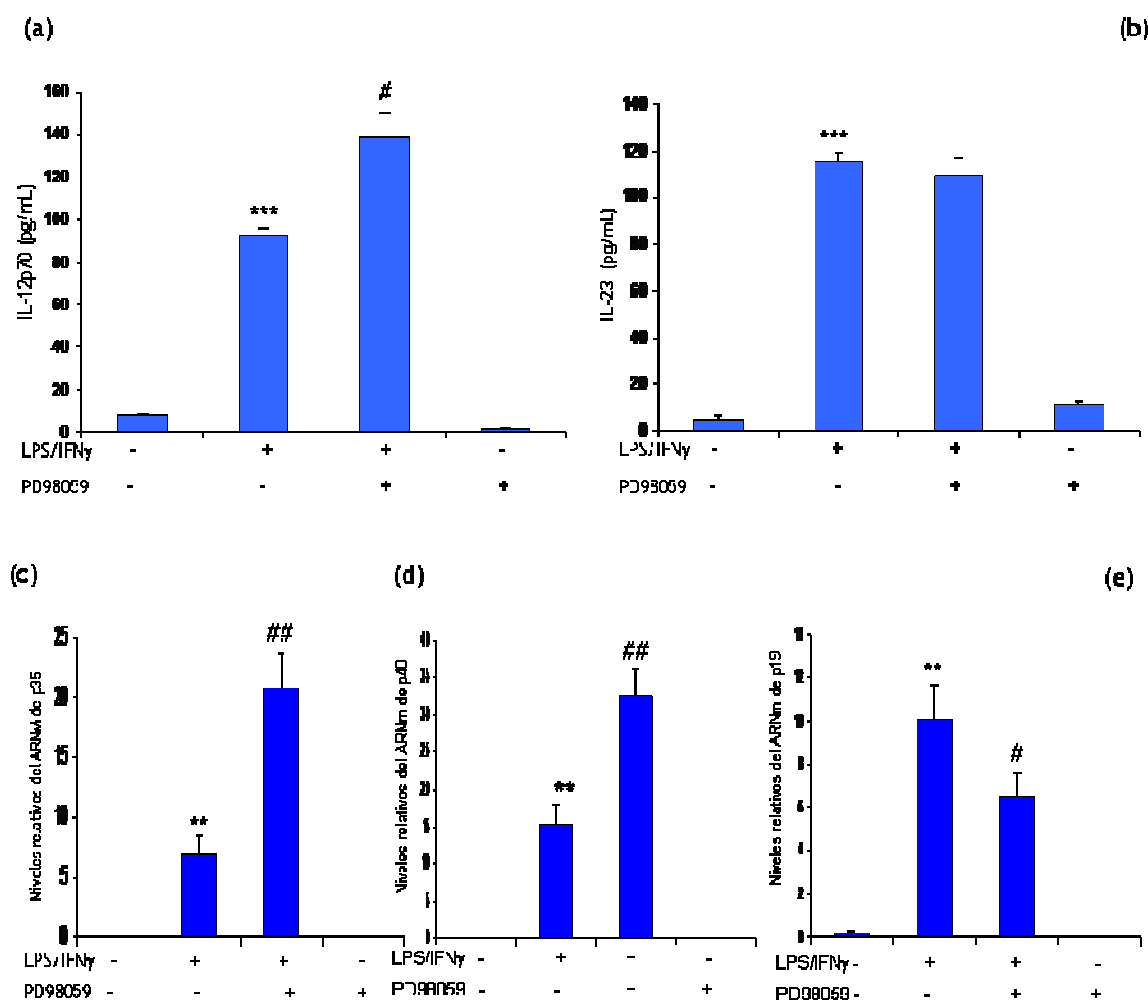
Una vez establecido el papel del receptor CB<sub>2</sub> en la regulación de la producción de las citoquinas IL-12 e IL-23, el siguiente objetivo fue estudiar qué vías de señalización participaban en este proceso. Para ello, y teniendo en cuenta la información aportada por la literatura científica, se procedió a evaluar la participación de las distintas MAPKs involucradas en la regulación la producción de IL-12, IL-23 y sus distintas subunidades constituyentes (Feng y col., 1999; Utsugi y col., 2003).

Como primera medida para dilucidar los mecanismos involucrados en los efectos de AEA sobre la síntesis de IL-12 e IL-23 en microglía, se analizó la activación de la vía de ERK1/2 en respuesta a LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia del endocannabinoide. Numerosos estudios muestran que esta vía de señalización juega un papel importante en la regulación de estas citoquinas, si bien algunos estudios son contradictorios entre sí. Así, Martin y col. (2003) y Kim y col. (2005) muestran que la vía de ERK1/2 regula negativamente la expresión de IL-12p40, mientras que la Sala y col. (2005) proponen un papel positivo de esta vía sobre dicha subunidad. Por lo tanto se decidió analizar si AEA utiliza la vía de ERK1/2 y si lo hace inhibiendo o activándola, y los efectos que a su vez tiene este segundo mensajero en la producción de las citoquinas biológicamente activas y sus subunidades. Para ello se realizó un curso temporal determinando el grado de fosforilación de ERK1/2 a distintos tiempos post-estímulo. Como puede observarse en la Fig. 19, la estimulación con LPS/IFN $\gamma$  indujo una activación progresiva de ERK1/2, con un pico a los 30



**Figura 19:** El cotratamiento con AEA potencia la fosforilación de ERK1/2 MAPK. El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) induce una activación gradual de la vía de ERK1/2-MAPK. Dicha activación es potenciada por la coadministración de AEA (10 $\mu$ M), manteniéndose el mismo perfil temporal de fosforilación, como se muestra en las curvas densitométricas. \* $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \*\* $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ .

minutos y una tendencia a retornar a los valores basales a los 60 minutos. El tratamiento con AEA potenció significativamente la fosforilación de ERK1/2 desde los 5 minutos iniciales, la cual se mantuvo elevada hasta los 60 minutos (\*\* $p < 0,01$ ), aunque manteniendo un perfil de activación similar al estímulo con LPS/IFN $\gamma$  solo. A continuación se procedió a evaluar la participación de esta MAPK en la regulación de las citoquinas biológicamente activas IL-12 e IL-23. Para ello se utilizó el inhibidor de la activación de ERK1/2, el PD98059. Este compuesto inhibe a la enzima MEK, la cual se halla corriente arriba de la vía de señalización de ERK1/2 y actúa sobre ésta fosforilándola. De esta manera, al inhibir MEK, se están inhibiendo todas las kinasas que se encuentran corriente abajo de la misma. Para ello se trató la microglía con el inhibidor de MEK, PD98059 (10 $\mu$ M), 15 minutos antes de realizar cualquier estímulo. Pasado ese tiempo, se estimularon las células con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de AEA. Se recolectaron los sobrenadantes a 18 horas post-estímulo y se determinaron por ELISA los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-23. La inhibición de la vía de ERK1/2 produjo un aumento en los niveles de IL-12 con respecto al estímulo con LPS/IFN $\gamma$  (Fig. 20a) mientras que los niveles de IL-23 no se vieron modificados (Fig. 20b). Ante este resultado se decidió examinar si la vía de ERK1/2 estaría regulando diferencialmente la expresión de las subunidades que conforman las citoquinas biológicamente activas. Para ello se repitió el tratamiento antes mencionado, recolectándose esta vez los ARN mensajeros para analizar la expresión de p35, p40 y p19 por PCR cuantitativa. Como se aprecia en la figura 20, la inhibición de ERK1/2 ocasionó un aumento en la expresión de los mensajeros de p35 (Fig. 20c) y p40 (Fig. 20d), mientras que se produjo una disminución de los niveles de p19 (Fig. 20e). Esta regulación diferencial de las subunidades que conforman las citoquinas biológicamente activas explicaría porqué cuando se inhibe ERK1/2 hay un aumento en la producción de IL-12 mientras que los niveles de IL-23 no se modifican. Por lo tanto, y en concordancia con los estudios de Martin y



**Figura 20: Efecto diferencial de la inhibición de la vía de ERK1/2 MAPK sobre la producción de IL-12 e IL-23 y sus respectivas subunidades.** (a) El bloqueo de la vía de ERK1/2 con el inhibidor específico PD98059 (10 $\mu$ M) induce un marcado aumento en la producción de IL-12 con respecto al estímulo con LPS/IFN $\gamma$  solo. \*\*\*p<0,001 vs. Control; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) La inhibición de la vía de ERK1/2 no modifica la producción de IL-23. \*\*\*p<0,001 vs. Control. (c) La vía de ERK1/2 MAPK regula negativamente la expresión del ARN mensajero de p35, ya que su inhibición con PD98059 (10 $\mu$ M) aumenta significativamente los niveles del mismo, determinados por PCR cuantitativa. \*\*p<0,001 vs. Control; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) Un efecto similar se encuentra cuando se determinan por PCR cuantitativa los niveles del mensajero de p40 cuando la vía de ERK1/2 está inhibida. \*\*p<0,001 vs. Control; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (e) La vía de ERK1/2 MAPK regula positivamente la expresión del ARN mensajero de p19, ya que al bloquear la vía con PD98059 los niveles de la misma se ven significativamente reducidos. \*\*p<0,001 vs. Control; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

col. (2003) y Kim y col. (2005), estos resultados apuntan a que ERK1/2 regula negativamente la expresión de IL-12. El hecho de que AEA potencie la fosforilación inducida por LPS/IFN $\gamma$  confirma el papel de ERK1/2 sobre la síntesis de IL-12 y arroja más información sobre los mecanismos moleculares de acción de este endocannabinoide.

Para determinar si este fenómeno está determinado por el tipo de estímulo inflamatorio o por si al contrario es más general, se realizaron experimentos similares, esta vez infectando las células microgliales con el TMEV. Otra vez, el estímulo inflamatorio indujo la activación de ERK1/2, la cual fue potenciada cuando se coadministró AEA (Fig. 21a). La

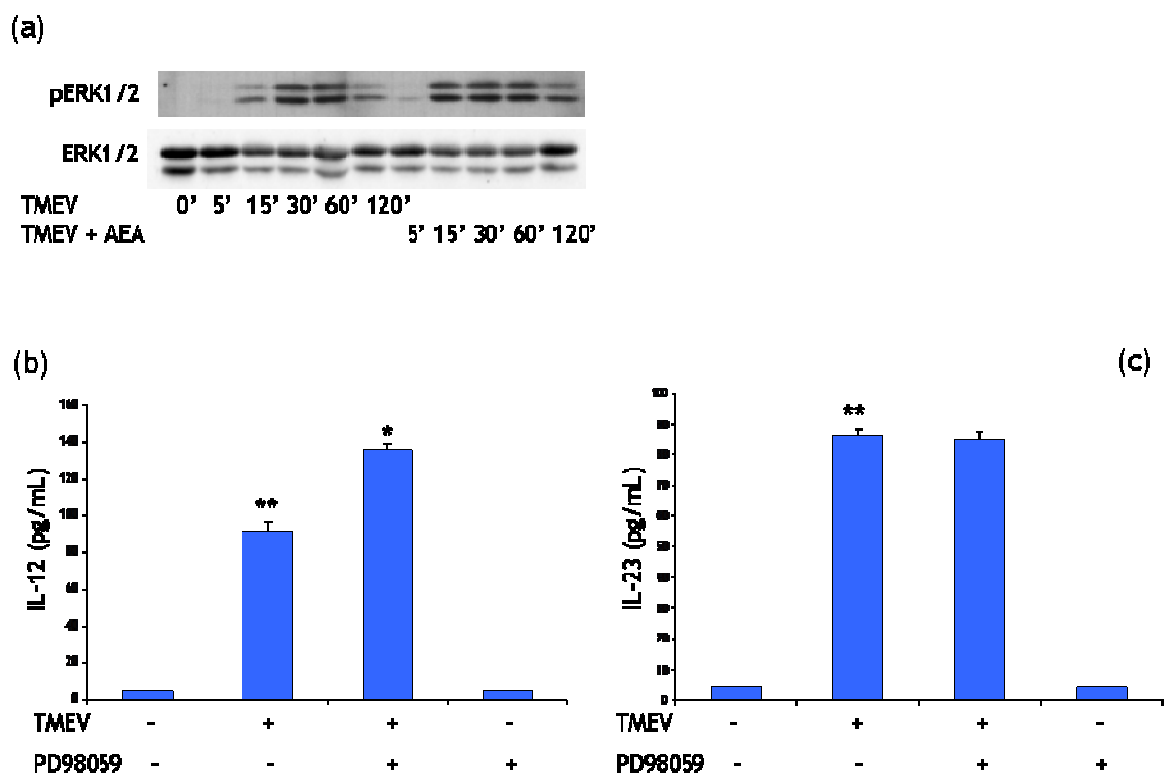


Figura 21: La infección *in vitro* de microglía con TMEV induce una activación de la vía de ERK1/2 la cual es potenciada por el tratamiento con AEA. (a) Western blot representativo del curso temporal de activación de ERK1/2 en respuesta al virus y/o al tratamiento con AEA (10 $\mu$ M). (b) La inhibición de la vía de ERK1/2 induce un aumento en la producción de IL-12 en respuesta al virus. \*\* $p < 0,01$  vs. Control; \* $p < 0,05$  vs. TMEV. (c) Los niveles de IL-23 no se ven modificados por el tratamiento con el inhibidor PD98059.

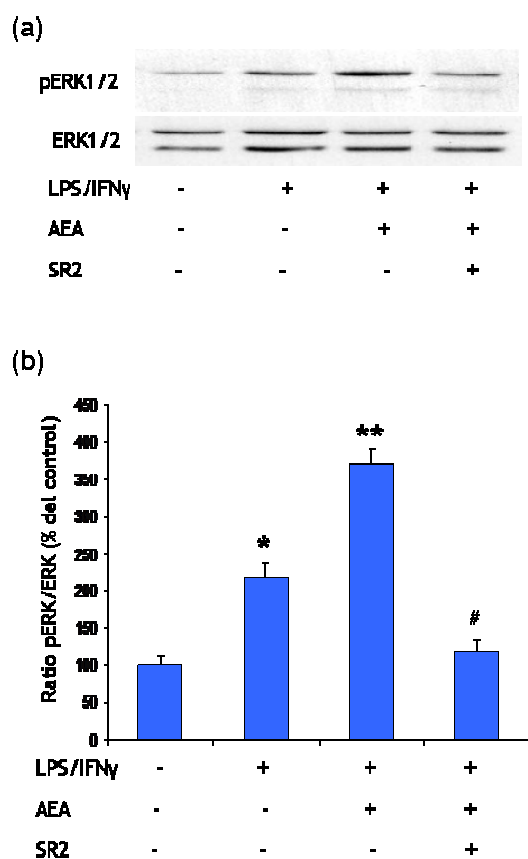


Figura 22: Participación del receptor CB<sub>2</sub> en la activación de la vía de ERK1/2. (a) Western blot representativo del efecto del antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1 $\mu$ M) sobre la activación de la vía de ERK1/2. El tratamiento con SR2 revierte la potenciación de la fosforilación de ERK1/2 inducida por AEA (10 $\mu$ M). (b) Valores densitométricos del grado de fosforilación de ERK1/2 en los distintos tratamientos. \* $p < 0,05$  vs. Control; \*\* $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; # $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA.

inhibición de MEK con PD98059 produjo un aumento en la producción de IL-12 (Fig. 21b) mientras que se no modificaron los niveles de IL-23 (Fig. 21c). En suma, en ambos casos AEA regula la expresión de IL-12 a través de la vía de ERK1/2, mientras que este mecanismo molecular parecería no estar implicado en la regulación de IL-23 por el endocannabinoide.

Con el fin de analizar si los efectos de AEA sobre la activación de ERK1/2 estaban mediados por el receptor CB<sub>2</sub>, se realizaron experimentos utilizando el antagonista SR2. Quince minutos antes de realizar los estímulos correspondientes, se incubaron las células con SR2 (1μM), de manera que al realizar los tratamientos con LPS/IFNγ en presencia o ausencia de AEA, los receptores CB<sub>2</sub> se hallasen bloqueados. A los 30 minutos post-estímulo se recolectaron las proteínas totales y se determinó el grado de fosforilación de ERK1/2 por *western blot*. Como se observa en la Fig. 22, cuando se antagonizó el receptor CB<sub>2</sub>, los niveles de activación de ERK1/2 volvieron casi a los niveles de control, lo que sugiere que AEA utiliza esta vía de señalización mediante este receptor.

a)

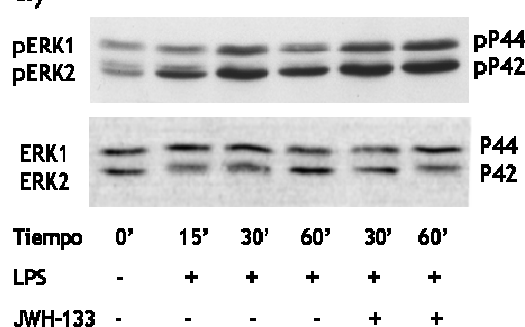
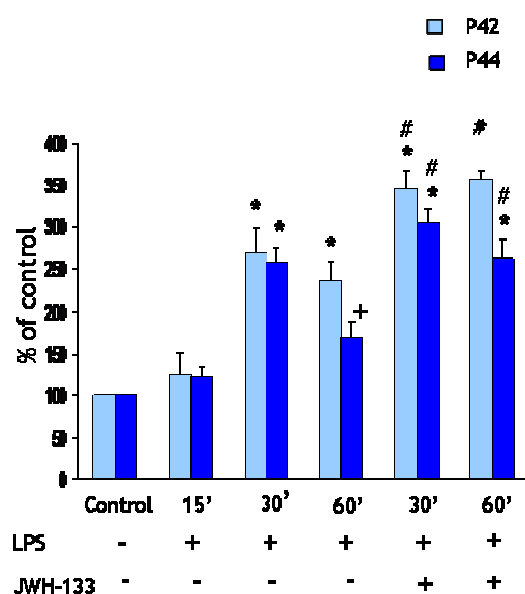
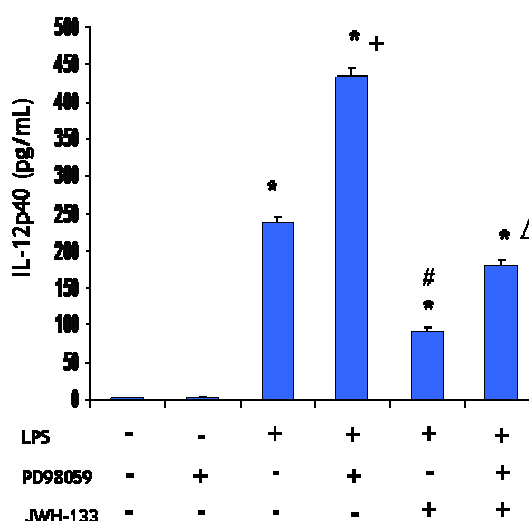


Figura 23: JWH-133, mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub> potencia la fosforilación de ERK1/2. (a) Western blot representativo de los efectos de JWH-133 sobre la activación de ERK1/2. (b) Valores densitométricos de los distintos tratamientos. \*p<0,001 vs. Control; +p<0,02 vs. Control; #p<0,001 vs. LPS (30 y 60min). (c) La inhibición de ERK1/2 con PD98059 revierte el efecto de JWH-133 sobre la expresión de IL-12p40. \*p<0,001 vs. Control; +p<0,001 vs. LPS; #p<0,001 vs LPS; Δp< 0,01 vs. LPS+JWH-133.

b)

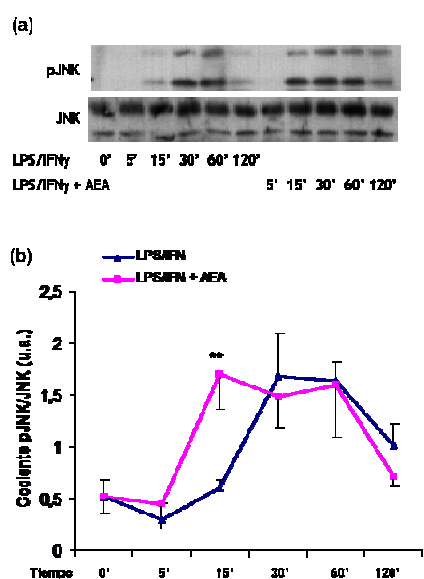


c)



Para confirmar estos hallazgos, se decidió utilizar el agonista específico CB<sub>2</sub>, el JWH-133 (100nM), en una serie de experimentos similares. De esta manera, se estimularon macrófagos con LPS (50ng/mL) a distintos tiempos, en presencia o ausencia de JWH-133. Como se aprecia en la Fig. 23a, el agonista CB<sub>2</sub> potenció la fosforilación de ERK1/2 a los 30 y 60 minutos. Esta activación sostenida de la vía de señalización se traduce en una disminución en la producción de IL-12p40, de acuerdo con otros resultados que muestran que la activación de ERK1/2 regula negativamente la síntesis de esta subunidad en células presentadoras de antígenos activadas (Yanagawa y col., 2002). Así, al inhibir la señalización vía ERK1/2 con el inhibidor de MEK, PD98059, los niveles de IL-12p40 aumentaron con respecto al tratamiento de LPS. Asimismo el tratamiento con PD98059 revirtió los efectos de JWH-133, indicando que este agonista, al activar al receptor CB<sub>2</sub>, actúa vía ERK1/2 para regular la producción de IL-12p40 (Fig. 23c).

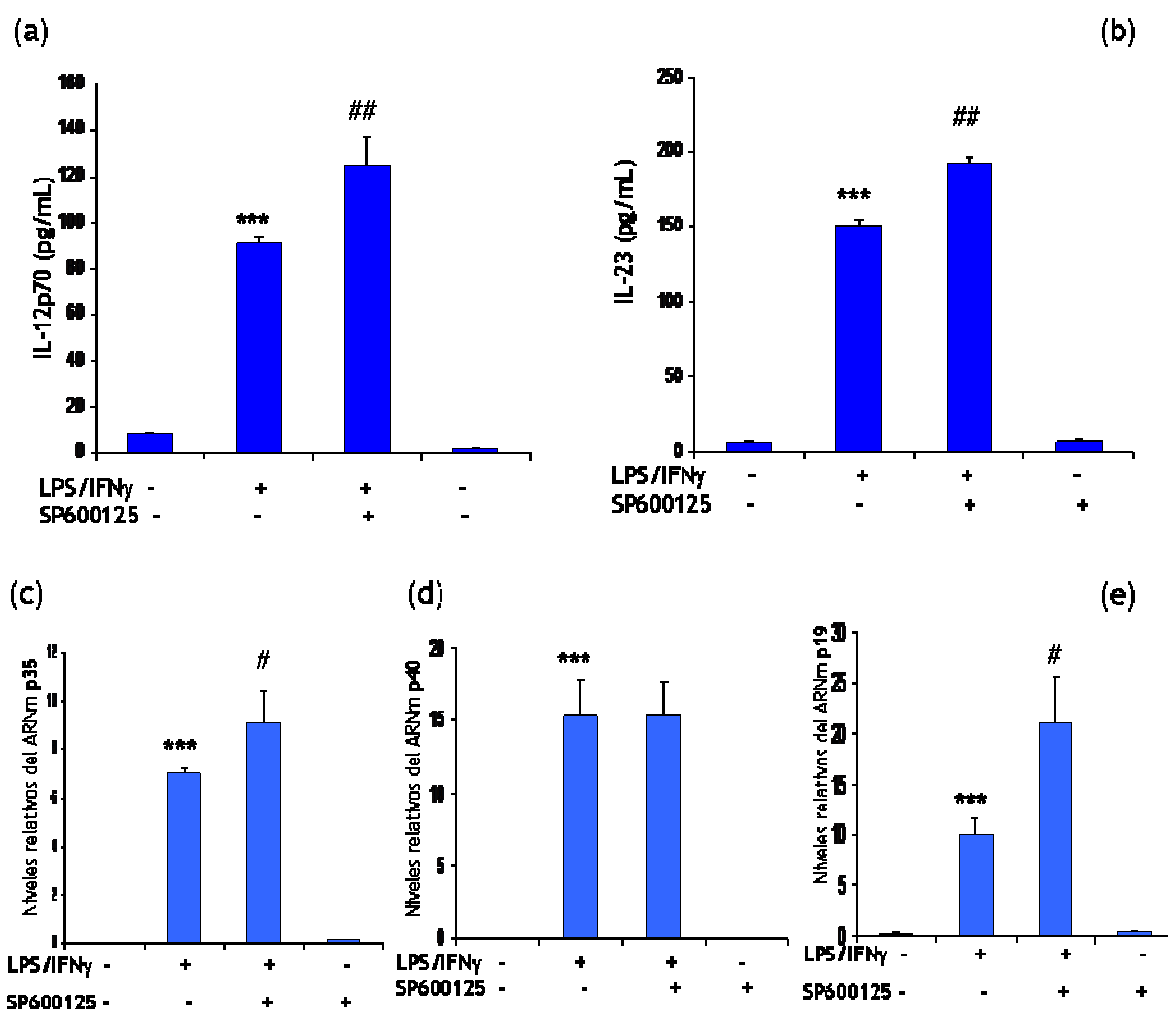
Una vez establecido el papel de la vía ERK1/2 en la producción de IL-12 e IL-23, se analizó la vía de JNK. Varios estudios sugieren que esta vía de señalización juega un papel sumamente importante en la regulación de estas citoquinas (Hidding y col., 2002), muchas veces con resultados contradictorios en cuanto a si su activación favorece (Waetzig y col., 2005) o impide (Utsugi y col., 2003) la producción de IL-12 e IL-23. Como primera medida se realizó un curso temporal el grado de fosforilación de JNK a distintos tiempos post-estímulo. La Fig. 24 muestra el perfil de activación de esta kinasa en presencia de LPS/IFN $\gamma$ , con un pico a los 30-60 minutos y una tendencia a regresar a valores basales a los 120 minutos. El tratamiento con AEA produjo una activación de JNK a tiempos menores (desplazamiento de la curva hacia la derecha), con un pico a los 15 minutos post-estímulo y que se sostiene hasta los 60 minutos. Por lo tanto, en presencia de AEA, JNK se fosforila antes y durante más tiempo (15-60 min). A continuación se procedió a evaluar la



**Figura 24:** El cotratamiento con AEA potencia la fosforilación de JNK MAPK. El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (50ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) induce una activación gradual de la vía de ERK1/2-MAPK. Dicha activación es “acelerada” por la coadministración de AEA (10 $\mu$ M), manteniéndose activada esta vía por más tiempo, como se muestra en las curvas densitométricas. \*\*p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ .



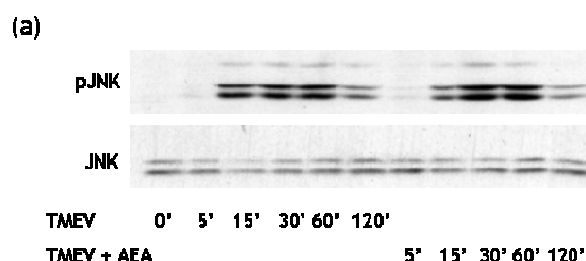
participación de JNK en la producción de las citoquinas biológicamente activas. Para ello se trataron los cultivos de microglía con un inhibidor de JNK, el SP600125 (10 $\mu$ M), 15 minutos antes de realizar cualquier estímulo. Pasado ese tiempo, se estimularon las células con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de AEA. Se recolectaron los sobrenadantes a las 18 horas post-estímulo y se determinaron por ELISA los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-23. La inhibición de JNK produjo un aumento en la síntesis de ambas interleuquinas (Fig. 25a y 25b) con respecto a los niveles con LPS/IFN $\gamma$  solo. Estos resultados contrastan con los obtenidos con la inhibición de ERK1/2, por lo que se procedió a analizar cómo JNK podría regular la expresión de las subunidades que forman estas citoquinas heterodiméricas. Así



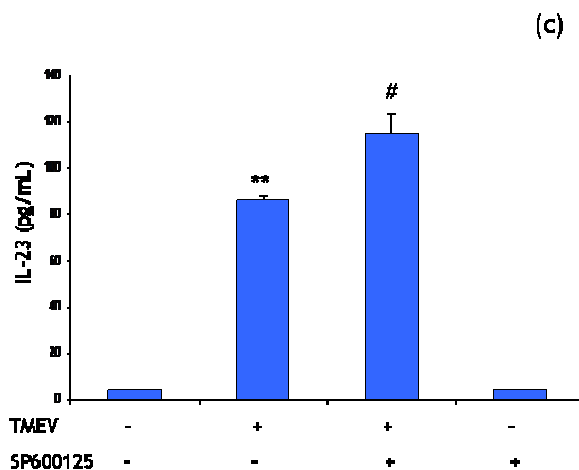
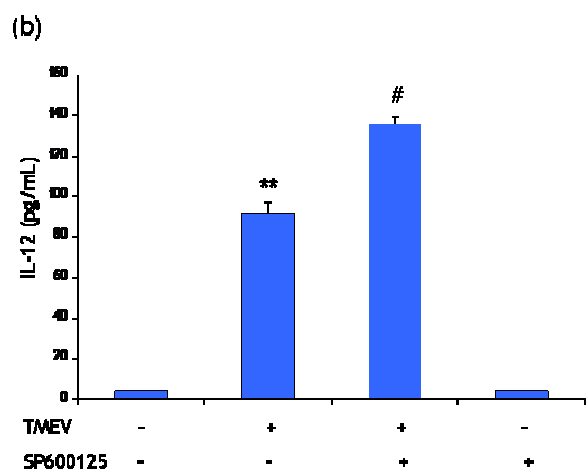
**Figura 25: Efecto diferencial de la inhibición de la vía de JNK MAPK sobre la producción de IL-12, IL-23 y sus respectivas subunidades.** (a) El bloqueo de la vía de JNK con el inhibidor específico SP600125 (10 $\mu$ M) induce un marcado aumento en la producción de IL-12 con respecto al estímulo con LPS/IFN $\gamma$  solo. \*\*\* $p$ <0,001 vs. Control; ## $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) La inhibición de la vía de JNK induce un aumento en la producción de IL-23. \*\*\* $p$ <0,001 vs. Control; ## $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (c) La vía de JNK MAPK regula negativamente la expresión del ARN mensajero de p35, ya que su inhibición con SP600125 (10 $\mu$ M) aumenta significativamente los niveles del mismo, determinados por PCR cuantitativa. \*\*\* $p$ <0,001 vs. Control; # $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) EN el caso de p40, la inhibición de JNK MAPK no tuvo ningún efecto sobre los niveles de expresión de su ARN mensajero. \*\*\* $p$ <0,001 vs. Control. (e) La vía de JNK MAPK regula negativamente la expresión del ARN mensajero de p19, ya que al bloquear la vía con SP600125, los niveles de la misma se ven significativamente aumentados. \*\*\* $p$ <0,001 vs. Control; # $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

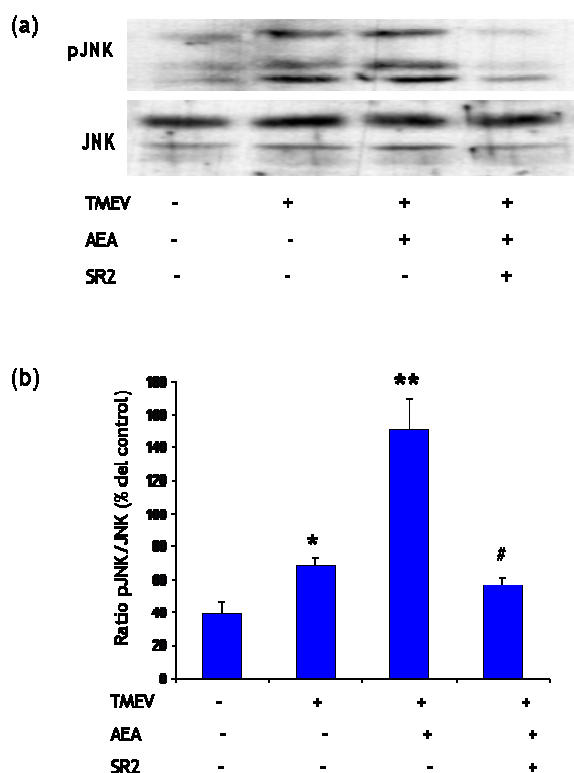
se repitieron los experimentos en presencia de SP600125, recogiendo esta vez los ARN para analizar por PCR cuantitativa los niveles de los mensajeros de p35, p40 y p19. Como se muestra en la Fig. 25, la inhibición de JNK modificó a la alta los niveles de los mensajeros de p35 (Fig. 25c) y p19 (Fig. 25e), pero no alteró los niveles del mensajero de p40 (Fig. 25d). De nuevo se aprecia una regulación diferencial de las distintas subunidades por parte de esta vía de señalización. El balance global de estos resultados sugiere que la vía de JNK participa negativamente en la regulación de IL-12 e IL-23, en concordancia con los resultados obtenidos por otros laboratorios (Hidding y col., 2003; Utsugi y col., 2005), actuando principalmente sobre las subunidades p35 y p19.

Dado nuestro interés en el modelo de Theiler, se realizó una serie de experimentos pero esta vez infectando las células microgliales con el virus. La infección *in vitro* de microglía con el virus de Theiler provocó una activación de JNK, la cual se vio potenciada por el cotratamiento con AEA (Fig. 26a). La inhibición de JNK con SP600125 produjo un aumento en la síntesis tanto de IL-12 como de IL-23, determinadas en los sobrenadantes de los cultivos (Fig. 26b y 26c). Estos resultados sugieren que JNK está implicada en la regulación negativa de ambas citoquinas. Con el fin de analizar si los efectos de AEA sobre la activación de JNK estaban mediados por el receptor CB<sub>2</sub>, se realizaron experimentos utilizando el antagonista SR2. Quince minutos antes de realizar los estímulos correspondientes, se incubaron las células con SR2 (1μM), de manera que al realizar los tratamientos con LPS/IFNγ en presencia o ausencia de AEA, los receptores CB<sub>2</sub> se hallaban blo-



**Figura 26:** La infección *in vitro* de microglía con TMEV induce una activación de la vía de JNK, activación que es acelerada por el tratamiento con AEA. (a) Western blot representativo del curso temporal de activación de JNK en respuesta al virus y/o al tratamiento con AEA (10μM). (b) La inhibición de la vía de JNK induce un aumento en la producción de IL-12 en respuesta al virus. \*\*p<0,01 vs. Control; #p<0,05 vs. TMEV. (c) La inhibición con SP600125 aumenta la producción de IL-23 inducida por el virus. \*\*p<0,01 vs. Control; #p<0,05 vs. TMEV.

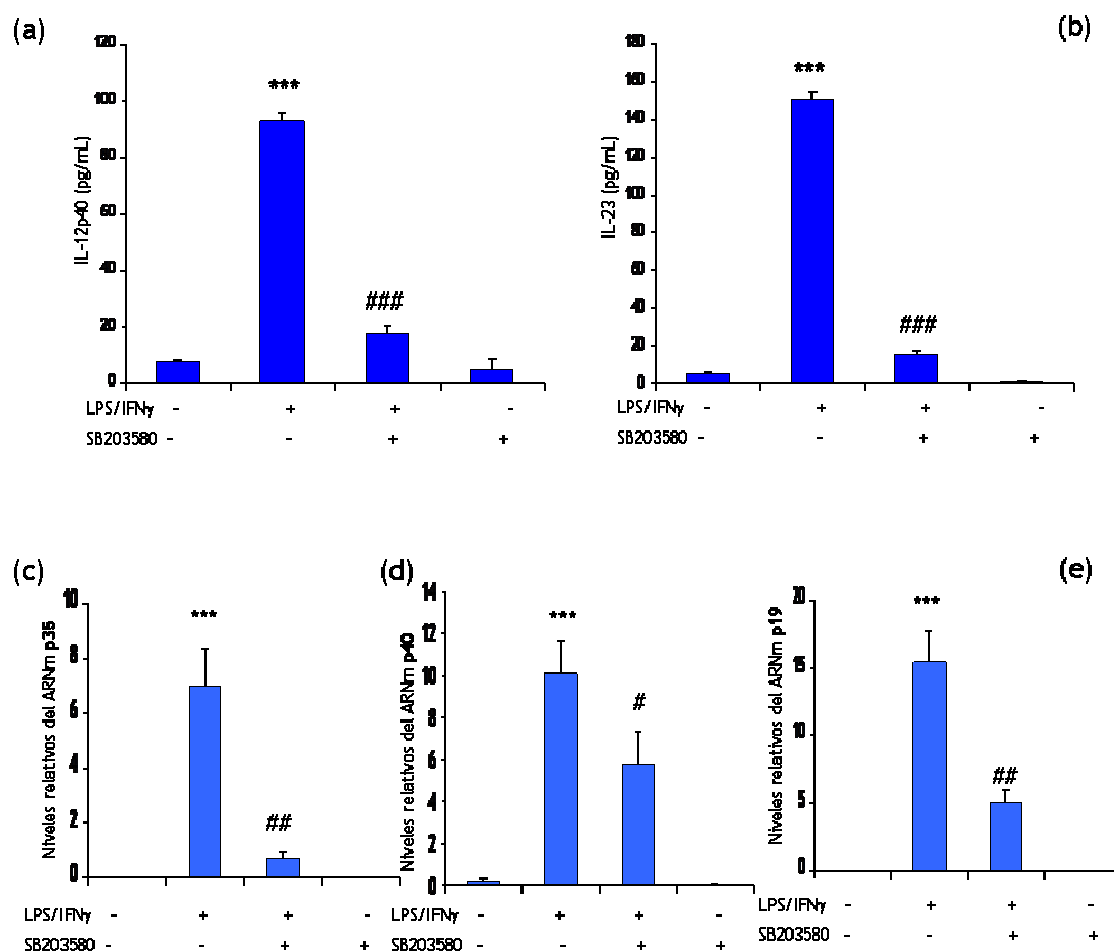




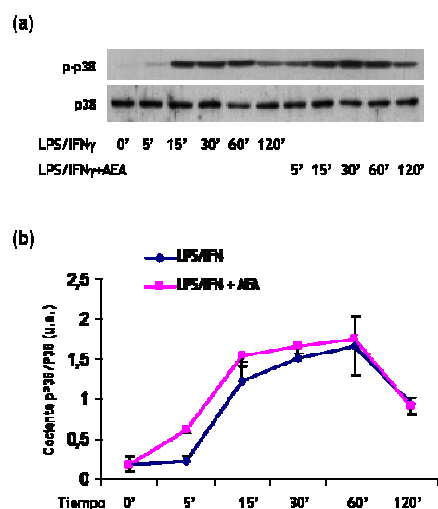
**Figura 27: Participación del receptor CB<sub>2</sub> en la activación de la vía de JNK.** (a) Western blot representativo del efecto del antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con SR2 (1μM) sobre la activación de la vía de JNK. El tratamiento con SR2 revierte la potenciación de la fosforilación de JNK inducida por AEA (10μM). (b) Valores densitométricos del grado de fosforilación de JNK en los distintos tratamientos. \*p<0,05 vs. Control; \*\*p<0,01 vs. LPS/IFNγ; #p<0,05 vs. LPS/IFNγ+AEA.

queados. A los 30 minutos post-estímulo se recolectaron las proteínas totales y se determinó el grado de fosforilación de JNK por *western blot*. Como se observa en la Fig. 27, cuando se antagonizó el receptor CB<sub>2</sub>, los niveles de activación de JNK volvieron casi a los niveles de LPS/IFNγ, lo que sugiere que AEA utiliza esta vía de señalización mediante este receptor.

A continuación se evaluó si AEA señalizaba vía p38, tercer miembro de la familia de las MAP kinasas. Varios trabajos resaltan el papel positivo que tiene la activación de esta vía en la producción de citoquinas, en particular de IL-12 (Kim y col., 2005). Con el fin de confirmar la relevancia de esta quinasa en la regulación tanto de las interleuquinas biológicamente activas como de sus respectivas subunidades, se utilizó el inhibidor de p38, el SB203580 (30μM), 15 minutos antes de realizar cualquier estímulo. Pasado ese tiempo, se estimularon las células con LPS/IFNγ en presencia o ausencia de AEA. Se recolectaron los sobrenadantes a las 18 horas post-estímulo y se determinaron por ELISA los niveles de las citoquinas IL-12 e IL-23. La inhibición de p38 produjo una marcada disminución de la síntesis de ambas interleuquinas (Fig. 28a y 28b) con respecto a los niveles con LPS/IFNγ solo. Estos resultados contrastan con los obtenidos con la inhibición de ERK1/2 y JNK, por lo que se procedió a analizar cómo p38 podría regular la expresión de las subunidades que forman estas citoquinas heterodiméricas. Así se repitieron los experimentos en presencia de SB203580, recogiendo esta vez los ARN mensajeros para analizar por PCR cuantitativa los niveles de los mensajeros de p35, p40 y p19. Como se muestra en la Fig. 28, la in-



**Figura 28: Efecto diferencial de la inhibición de la vía de p38 MAPK sobre la producción de IL-12, IL-23 y sus respectivas subunidades.** (a) El bloqueo de la vía de p38 con el inhibidor específico SB203580 (30 $\mu$ M) induce una marcada reducción en la producción de IL-12. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; ### $p < 0,005$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) La inhibición de la vía de p38 induce una disminución marcada en la producción de IL-23. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; ### $p < 0,005$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (c) La vía de p38 MAPK regula positivamente la expresión del ARN mensajero de p35, ya que su inhibición con SB203580 (30 $\mu$ M) reduce significativamente los niveles del mismo, determinados por PCR cuantitativa. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; ## $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) En el caso de p40, la inhibición de p38 MAPK redujo los niveles de expresión de su ARN mensajero. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; # $p < 0,05$ . (e) La vía de p38 MAPK regula positivamente la expresión del ARN mensajero de p19, ya que al bloquear la vía con SB203580, los niveles de la misma se ven significativamente reducidos. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; ## $p < 0,01$  vs. LPS/IFN $\gamma$ .



**Figura 29: Efecto de AEA sobre la activación de p38 MAPK inducida por LPS/IFN $\gamma$ .** El tratamiento de microglía con LPS/IFN $\gamma$  induce una activación de la vía de p38 MAPK siguiendo un patrón temporal con un pico a los 60 minutos post-estimulo. Dicho patrón temporal de activación no se ve modificada por el cotratamiento con AEA (10 $\mu$ M).

hibición de p38 modificó redujo los niveles de los mensajeros de p35 (Fig. 28c), p19 (Fig. 28e) y en menor medida de p40 (Fig. 28d). Se colige, entonces, que la vía de p38 está involucrada positivamente en la regulación tanto de IL-12 como de IL-23 y sus respectivas subunidades constituyentes. Cuando se analizó si AEA podría estar actuando a través de esta vía de señalización mediante el receptor CB<sub>2</sub>, se observó que el endocannabinoide no modificaba los niveles de fosforilación ni su patrón temporal de activación (Fig. 29). Estos resultados sugieren que AEA no señaliza vía p38, aún cuando se observe un ligero aumento de la fosforilación a los 5 minutos que no alcanza significación estadística cuando se compara con los niveles de activación en respuesta a LPS/IFN $\gamma$  solo.

Una vez evaluadas las vías de las MAPKs se procedió a analizar la participación de la vía de la PI3K/Akt. Numerosos estudios sugieren que esta vía también participa en la regulación de IL-12 (la Sala y col., 2005) e IL-23 (Yang y col., 2006), por lo que se planteó estudiar si AEA regula a estas citoquinas mediante este segundo mensajero. La Fig. 30 muestra el perfil de activación de esta vía en presencia de LPS/IFN $\gamma$ , con un pico de fosforilación tan rápido como a los 5 minutos post-estímulo. El tratamiento con AEA, por el contrario, inhibió la activación de Akt desde los 5 minutos iniciales. Por lo tanto, en presencia de AEA, la fosforilación de Akt está inhibida. Cuando se analizó la participación de esta vía mediante la inhibición farmacológica con la utilización de dos inhibidores comunes, Ly294002 (10 $\mu$ M) y wortmanina (100nM), en la síntesis de IL-12 (Fig. 31a y 31c) e IL-23 (Fig. 31b y 31d), se observó que Akt regula negativamente la síntesis de las mismas. De esta manera, al inhibir la vía de Akt, la producción de estas citoquinas disminuye marcadamente.

De los resultados hasta aquí obtenidos se desprende que AEA ejerce sus efectos sobre IL-12 e IL-23 mediante la activación de ERK1/2 y de JNK, mientras que en el caso de

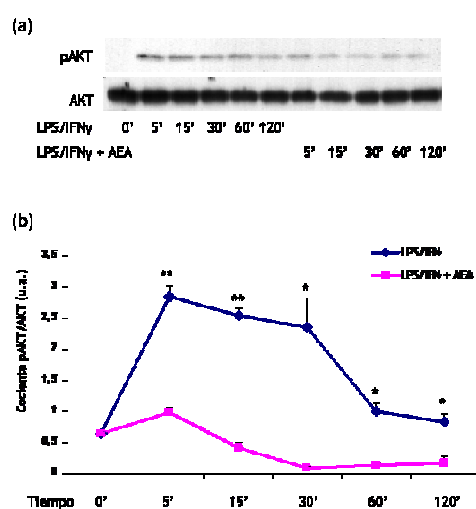
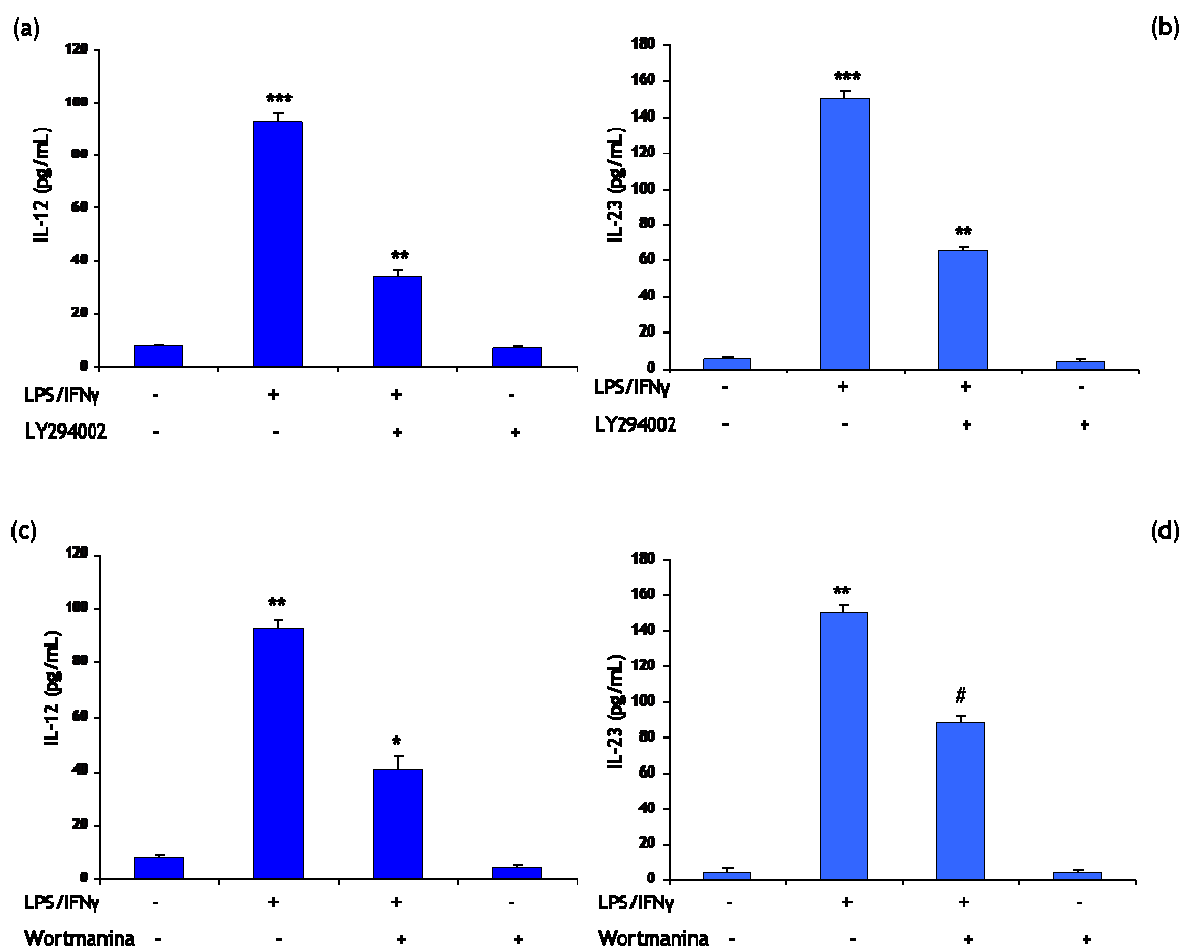


Figura 30: Efecto del tratamiento con AEA sobre la activación de la vía de PI3K/Akt inducida por LPS/IFN $\gamma$ . El estímulo con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) inducen la activación de la vía de AKT/PI3K. Sin embargo, el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) reduce dicha activación, como se muestra en el análisis densitométrico. \*p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \*\*p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

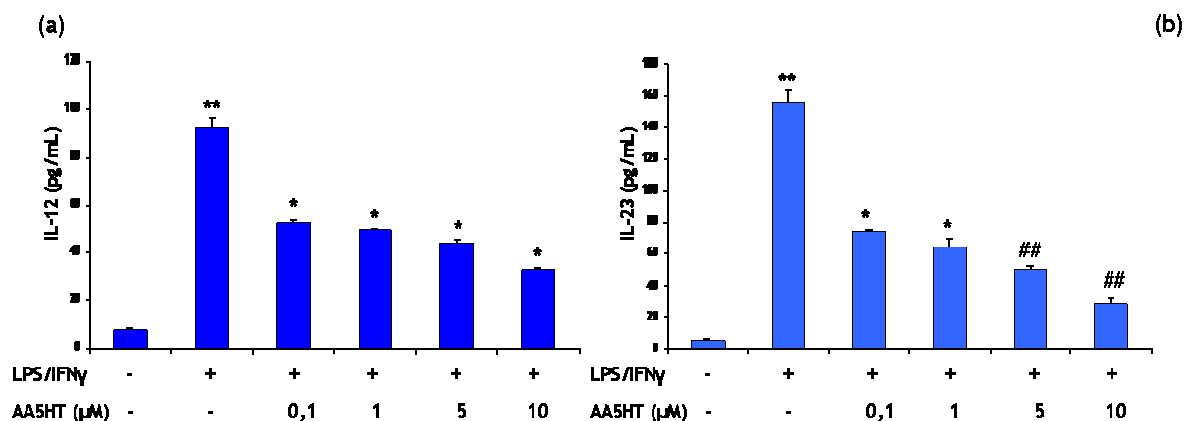
Akt su mecanismo de acción es inhibir esta vía. Además la vía de ERK1/2 está involucrada únicamente en la regulación negativa de IL-12, ya que no modifica los niveles de IL-23 al actuar en forma diferencial sobre los niveles de p19. La vía del JNK por el contrario, si bien no afecta a la expresión de p40, participa en forma negativa en la regulación de ambas citoquinas. De igual manera, Akt regula positivamente su expresión, por tanto el hecho de que AEA inhiba la activación de esta vía podría contribuir a la regulación negativa de este endocannabinoide sobre IL-12 e IL-23.



**Figura 31: Efecto de la inhibición de la vía de AKT/PI3K sobre la producción de IL-12 e IL-23.** (a) La inhibición de la vía de AKT/PI3K con LY294002 (10μM) reduce marcadamente la producción de IL-12, evaluada por ELISA en los sobrenadantes de cultivos primarios de microglía. \*\*\*p<0,001 vs. Control; \*\*p<0,005 vs. LPS/IFNγ. (b) Un efecto similar se encuentra para el caso de IL-23, por lo que la vía de AKT regula positivamente la síntesis de estas citoquinas. \*\*\*p<0,001 vs. Control; \*\*p<0,005 vs. LPS/IFNγ. (c) El tratamiento con otro inhibidor de la vía de AKT, la wortmanina (100nM), produce efectos similares. Así, la producción de IL-12 se ve reducida por el tratamiento con wortmanina. \*\*p<0,005 vs. Control; \*p<0,01 vs. LPS/IFNγ. (d) El mismo efecto se observa en el caso de IL-23. \*\*p<0,005 vs. Control; #p<0,05 vs. LPS/IFNγ.

### 3.4 El aumento del tono endógeno de AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23.

Puesto que la administración *in vivo* del inhibidor de la FAAH, el AA-5HT, producía una disminución en la expresión de las subunidades p35, p40 y p19 en la médula espinal



**Figura 32: Efecto de la inhibición de la enzima FAAH en la producción de IL-12 e IL-23 inducida por LPS/IFNγ. (a)** Dosis-respuesta del inhibidor de la enzima FAAH, el AA5HT. La inhibición de la principal enzima involucrada en la degradación de AEA aumenta los niveles del edoncannabinoide provocando una reducción en la producción de IL-12. \*\* $p < 0,001$  vs. Control; \* $p < 0,01$  vs. LPS/IFNγ. **(b)** Dosis-respuesta del inhibidor de la enzima FAAH, el AA5HT. La inhibición de la principal enzima involucrada en la degradación de AEA aumenta los niveles del edoncannabinoide provocando una reducción en la producción de IL-23. \*\* $p < 0,001$  vs. Control; \* $p < 0,01$  vs. LPS/IFNγ; ## $p < 0,005$  vs. LPS/IFNγ

de ratones con TEMV-IDD, se decidió evaluar el efecto de este inhibidor sobre la producción de las citoquinas biológicamente activas en un cultivo primario de microglía. Para ello se estimularon las células con LPS/IFNγ en presencia de distintas dosis de AA5HT, se recolectaron los sobrenadantes a las 18 horas post-estímulo y se determinaron los niveles de IL-12 e IL-23 mediante ELISAs. La Fig.32 muestra que la inhibición de FAAH, con el consiguiente aumento del tono endógeno de AEA, reduce de manera dosis-dependiente la producción de IL-12 (Fig.32a) e IL-23 (Fig.32b).

Estos resultados sugieren que la modulación del sistema cannabinoide endógeno es una diana potencialmente útil en la regulación de mediadores pro-inflamatorios, y por lo tanto del proceso inflamatorio en general.





**4. AEA potencia la síntesis de IL-10: evidencias de una regulación autocrina de IL-10 endógena sobre la producción de IL-12.**



IL-10 e IL-12 juegan un papel crucial en la polarización de las respuestas de la célula T. La respuesta adaptativa a infecciones se caracteriza por la diferenciación de células T hacia un fenotipo Th1 o Th2, los cuales además favorecen la respuesta celular o humoral, respectivamente. La respuesta Th1 está regulada positivamente por IL-12 e IFN $\gamma$ , mientras IL-10, en sinergismo con IL-4, favorece una respuesta Th2.

Las células de estirpe macrofágico/microglial pueden producir citoquinas, como IL-10 e IL-12, que son esenciales para el desarrollo y mantenimiento de las células T. Por lo tanto, cabría esperar que existiera una influencia recíproca entre estas citoquinas que originara un microambiente tal que favoreciera un tipo de respuesta u otro, dependiendo del tipo dominante de citoquina producida (Shnyra y col., 1998; Harizi y col., 2004).

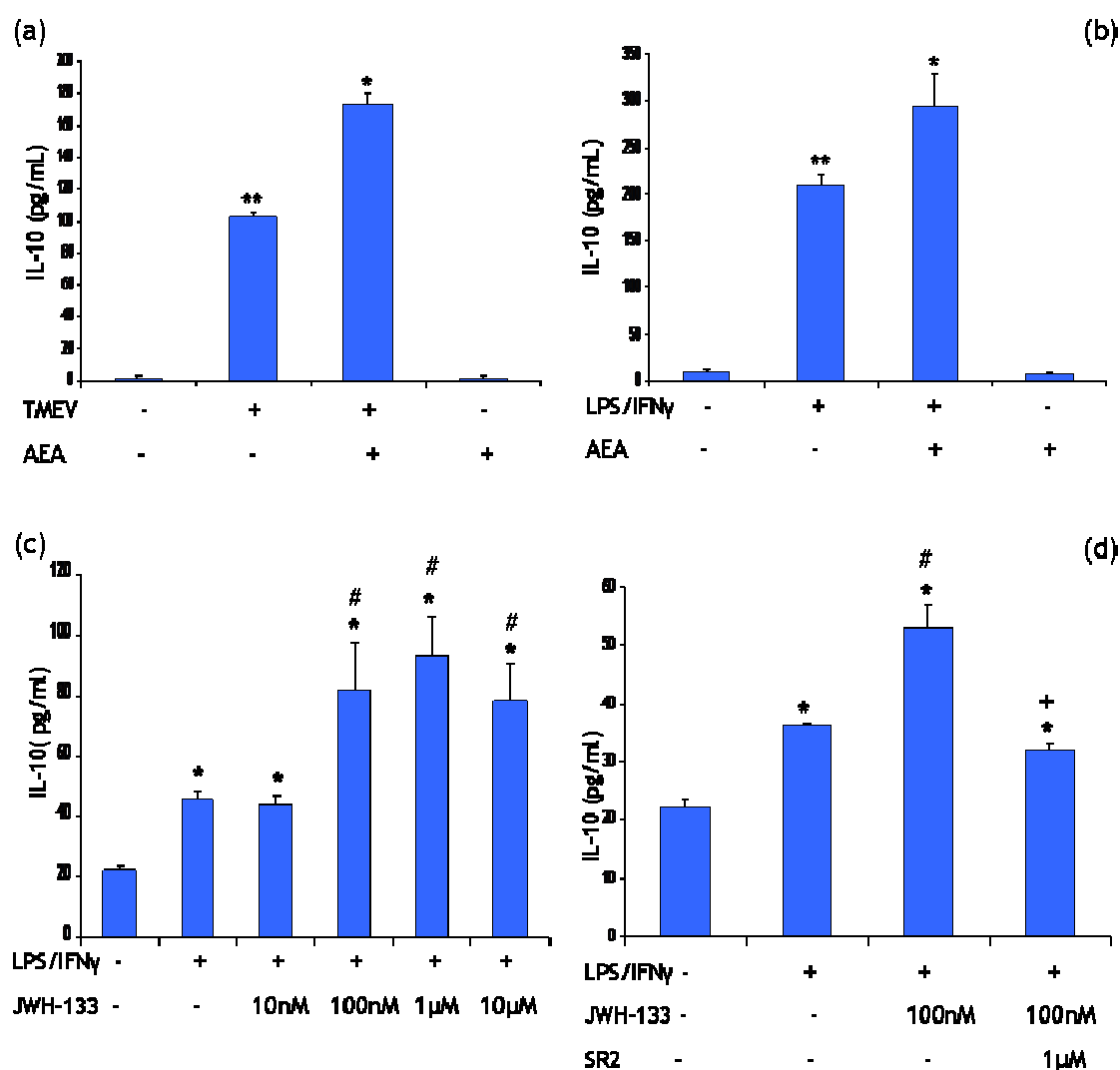
Por otro lado, varios estudios señalan el papel anti-inflamatorio de IL-10 en distintas patologías del SNC (Ishizu y col., 2006). En particular, Molina-Holgado y col. (2002) muestran que el tratamiento con IL-10 disminuye la expresión de COX-2 inducida por la infección con TMEV en cultivos primarios de astrocitos.

Debido a estos antecedentes se decidió analizar el papel de AEA sobre la expresión de IL-10 y los mecanismos moleculares implicados, además de evaluar si la producción endógena de IL-10 podría tener algún efecto sobre la producción de IL-12 y/o IL-23.

#### **4.1 AEA potencia la producción de IL-10 inducida por la infección *in vitro* con TMEV y por LPS/IFN $\gamma$ : participación del receptor CB<sub>2</sub>.**

Como primer paso para analizar el efecto de AEA sobre la producción de IL-10 se realizó la determinación de esta citoquina en sobrenadantes de cultivos primarios de microglía previa infección con TMEV en presencia o ausencia del endocannabinoide. Como puede observarse en la Fig. 33, el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) indujo un aumento significativo en la producción de IL-10 inducido por la infección *in vitro* con el virus de Theiler (Fig. 33a). Del mismo modo, el tratamiento de las células con LPS/IFN $\gamma$  indujo un aumento en la expresión de esta citoquina, la cual fue potenciada por el tratamiento con AEA (Fig. 33b). A fin de evaluar la participación del receptor CB<sub>2</sub> sobre la producción de IL-10 en cultivos primarios de macrófagos, se realizaron tratamientos similares con el agonista selectivo CB<sub>2</sub>, el JWH-133. Primeramente se efectuó una curva dosis-respuesta, encontrándose que el tratamiento con diferentes dosis de JWH-133 potenciaba la síntesis de IL-10, aunque con un comportamiento farmacológico de U-invertida (Fig. 33c). Asimismo, cuando se utilizó el antagonista del receptor CB<sub>2</sub>, el SR2 (1 $\mu$ M), los efectos de JWH-133 (100nM) sobre la producción de IL-10 se vieron completamente revertidos (Fig. 33d). Estos datos indican claramente la participación de este receptor en los efectos de AEA sobre la

síntesis y expresión de esta citoquina anti-inflamatoria.



**Figura 33:** AEA potencia la síntesis de IL-10 en respuesta a la infección con el virus de Theiler y al tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  mediante un mecanismo dependiente del receptor CB $_2$ . (a) La infección *in vitro* con TMEV produce un aumento en la síntesis de IL-10, determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de macrófagos. El tratamiento con AEA (10 $\mu$ M) potenció la producción de esta citoquina. \*\* $p < 0,01$  vs. Control; \* $p < 0,05$  vs. TMEV. (b) EL tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  también indujo un aumento en la síntesis de IL-10, la cual fue potenciada por el tratamiento con AEA (10 $\mu$ M). Los niveles de IL-10 se determinaron por ELISA en sobrenadantes de cultivos de microglía. \*\* $p < 0,01$  vs. Control; \* $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (c) El agonista específico CB $_2$ , el JWH-133, indujo un aumento de la síntesis de IL-10 de manera dosis-dependiente, indicando la participación del receptor CB $_2$  en dicho efecto. \* $p < 0,05$  vs. Control; # $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) El pre-tratamiento con el antagonista específico CB $_2$ , el SR2 (1 $\mu$ M) revirtió el efecto de JWH-133 sobre el aumento de la producción de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$ , confirmando la participación de dicho receptor en los efectos mediados por el agonista cannabinoide. \* $p < 0,05$  vs. Control; # $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ +JWH-133.

#### 4.2 Mecanismos moleculares de acción de AEA sobre la producción de IL-10.

Una vez establecido el papel potenciador de AEA sobre la producción de IL-10 y la participación del receptor CB $_2$  en la misma, se decidió evaluar las posibles vías de señal-

zación implicadas en el efecto del endocannabinoide sobre la citoquina.

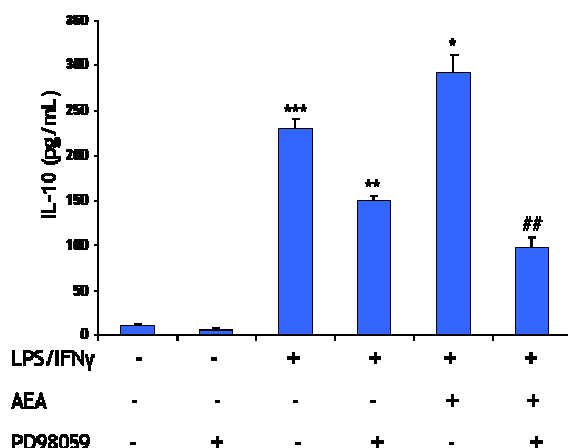


Figura 34: La inhibición farmacológica de la vía de ERK1/2 MAPK con PD98059 revierte los efectos de AEA sobre la síntesis de IL-10. El tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  induce la expresión de IL-10 en cultivos primario de microglía. El cotratamiento con AEA (10 $\mu$ M) potencia dicha expresión, la cual es revertida por la inhibición de la vía de ERK1/2 MAPK con PD98059 (10 $\mu$ M). \*\*\*p<0,001 vs. Control; \*\*p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \*p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ##p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA.

La primera vía de señalización analizada fue la de ERK1/2 MAPK. Para ello se realizaron tratamientos con el inhibidor de MEK, el PD98059 (10 $\mu$ M), 15 minutos antes de realizar los correspondientes tratamientos con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de AEA. La figura 34 muestra los efectos de la inhibición de ERK1/2 sobre la síntesis de IL-10. Como puede observarse, el tratamiento con PD98059 inhibió claramente tanto la síntesis de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$  como la potenciada por AEA, indicando una participación positiva de esta vía en la regulación de esta citoquina. Estos resultados contrastan con los obtenidos para IL-12, donde la vía de ERK1/2 MAPK mostraba jugar un papel negativo en la producción estas citoquinas. Por lo tanto, AEA actuaría potenciando la fosforilación de ERK1/2 favoreciendo la síntesis de IL-10 e inhibiendo la producción de IL-12.

La segunda vía que se estudió fue la de JNK MAPK. Para ello se realizaron tratamientos con el inhibidor de JNK, el SP600125 (10 $\mu$ M), 15 minutos antes de realizar el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$ . Como se muestra en la figura 35a, la inhibición de JNK revirtió marcadamente la producción de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$ , sugiriendo que esta vía se encuentra implicada positivamente en la síntesis de esta citoquina anti-inflamatoria. Este hallazgo contrasta con los observados para IL-12 e IL-23, donde la vía de JNK juega un papel negativo en la síntesis de estas citoquinas. Por lo tanto, AEA actuaría activando la vía de JNK, la cual a su vez favorece la síntesis de IL-10 e inhibe la síntesis tanto de IL-12 como de IL-23.

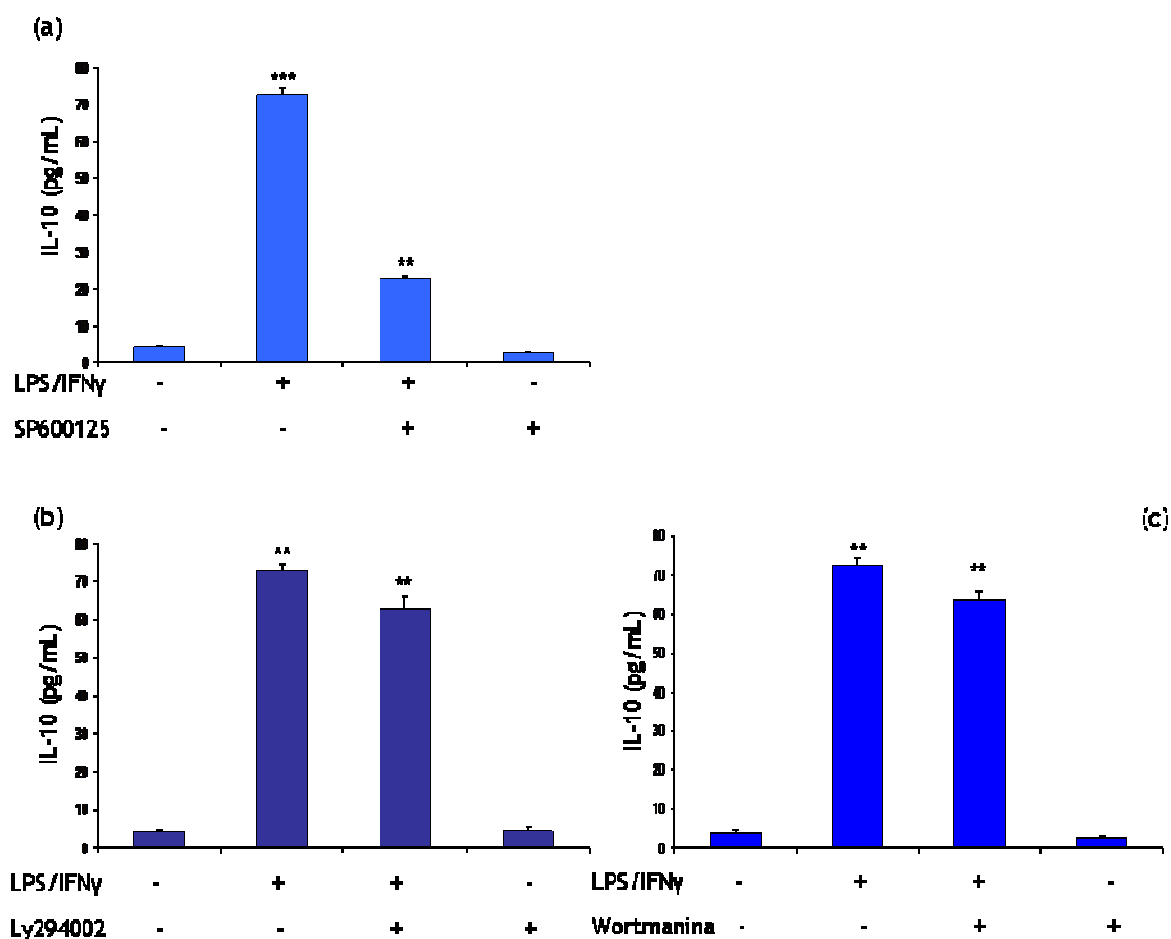
Teniendo en cuenta que AEA no modificaba los tiempos ni el patrón de fosforilación de p38, se decidió no evaluar la participación de esta vía sobre la producción de IL-10.

A continuación se analizó la participación de la vía de PI3K/Akt. Esta vía participa positivamente en la producción de IL-12 e IL-23, ya que la inhibición farmacológica de la misma tanto con Ly294002 como con wortmanina reducía la expresión de ambas citoquinas. Cuando se analizó el papel de esta vía en la síntesis de IL-10 se observó que la inhibi-

ción farmacológica de la misma no afectaba a los niveles de esta citoquina anti-inflamatoria (aún cuando se observara una ligera disminución, ésta no alcanzó significancia estadística). Por lo tanto, se concluye que la vía de PI3K/Akt participa en los efectos de AEA sobre la potenciación de la síntesis de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$  (Fig. 35b y 35c).

Por lo tanto, y a modo de conclusión general, AEA actúa a través del receptor cannabinóide CB<sub>2</sub> potenciando la activación de la vía de ERK1/2, la cual a su vez reduce la producción de IL-12 y aumenta la de IL-10. Asimismo, AEA induce una activación más temprana de la vía de JNK, la cual a su vez tiene un efecto negativo sobre la síntesis de IL-12 e IL-23, mientras que tiene un efecto positivo sobre la síntesis de IL-10.

Dadas estas observaciones, se procedió a evaluar entonces si la producción endógena de IL-10, inducida por AEA, podría estar regulando a su vez, mediante un mecanismo autocrino, la producción de IL-12 e IL-23.



**Figura 35: Efecto de la inhibición farmacológica de las vías de JNK MAPK y de PI3K/Akt sobre la síntesis de IL-10.** (a) La inhibición farmacológica de la vía de JNK MAPK con SP600125 (10 $\mu$ M) reduce marcadamente la producción de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$ , sugiriendo que esta vía participa positivamente en la síntesis de esta citoquina. \*\*\* $p < 0,001$  vs. Control; \*\* $p < 0,005$  vs. LPS/IFN $\gamma$  (b) La inhibición farmacológica de la vía de PI3K/Akt con Ly294002 no ejerció efectos estadísticamente significativos sobre la producción de IL-10. Por lo tanto esta vía no estaría implicada en los efectos de AEA sobre el aumento de la producción de IL-10 inducida por LPS/IFN $\gamma$ . \*\* $p < 0,005$  vs. Control. (c) De igual manera se encontró una falta de efecto sobre la producción de IL-10 se encontró cuando se inhibió farmacológicamente la vía de PI3K/Akt con wortmanina (100nM), confirmando que esta vía no participa en la regulación de los niveles de IL-10 producida por AEA. \*\* $p < 0,005$  vs. Control.

### 4.3 La producción endógena de IL-10 regula de manera autocrina la síntesis de IL-12 e IL-23.

Varios estudios resaltan el delicado balance en la producción de citoquinas pro- y anti-inflamatorias, y las intrincadas regulaciones mutuas que se ejercen en el establecimiento de este equilibrio metaestable (Aste-Amezaga y col., 1998; Shnyra y col., 1998; Harizi y col., 2004). En particular, diversos estudios demuestran la capacidad de IL-10 de regular la expresión de IL-12 en distintas patologías (Fiorentino y col., 1991; D'Andrea y col., 1993; Keller y col., 2006), y en sus respectivos modelos animales (Enk y col., 1993; De Smedt y col., 1997; Peng y col. 2006). Dados estos antecedentes, se analizó si el aumento en la producción de IL-10 inducida por AEA podría participar en la regulación autocrina de IL-12 e IL-23. Para ello se trataron los cultivos primarios de microglía con un anticuerpo bloqueante de IL-10, a fin de neutralizar la citoquina sintetizada *de novo*, previo al estímulo con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de AEA. Como se observa en la figura 36, el tratamiento con este anticuerpo (5 $\mu$ g/mL) no sólo potenció los efectos de LPS/IFN $\gamma$  tanto en la síntesis de IL-12 (Fig. 36a) como en la de IL-23 (Fig. 36b), sino que además revirtió significativamente los efectos de inhibitorios de AEA, indicando que la producción endógena de IL-10 juega un papel importante en los efectos del endocannabinoides sobre la síntesis de IL-12 e IL-23. Aunque cabe destacar que los efectos sobre IL-12 fueron más pronunciados que sobre IL-23. De igual manera el efecto de la administración exógena de

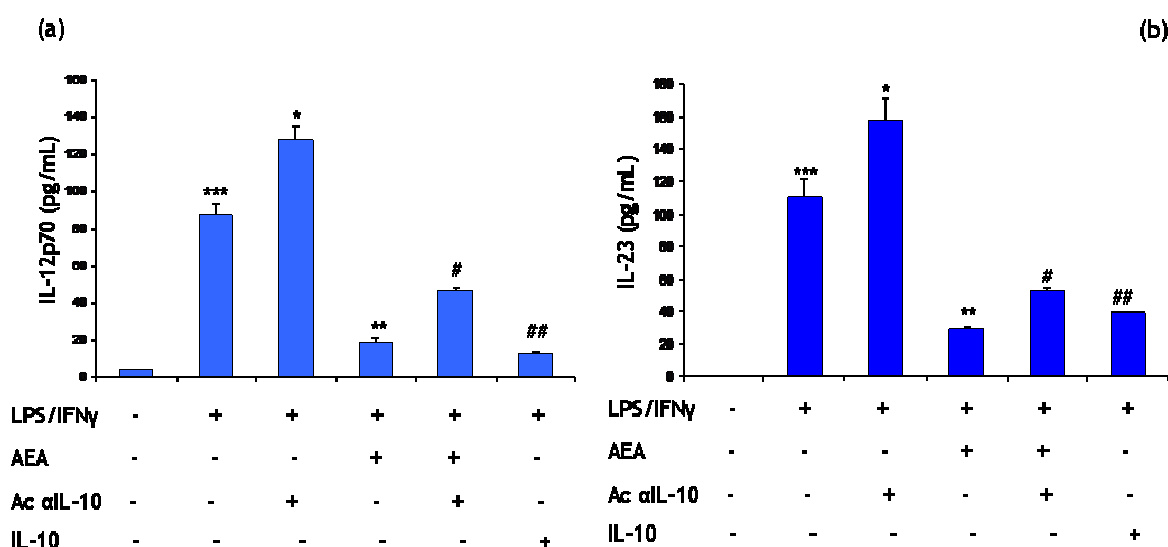
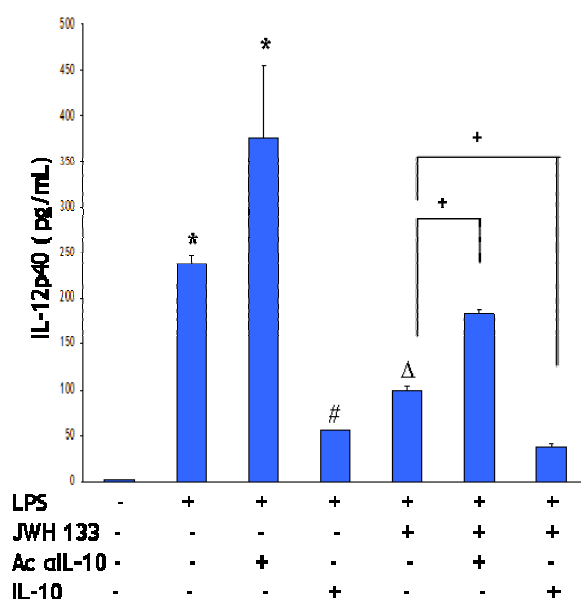


Figura 36: El bloqueo de IL-10 naciente con un anticuerpo específico contra esta citoquina produce un aumento de los niveles de IL-12 e IL-23. Además revierte parcialmente el efecto de AEA, indicando que la producción endógena de IL-10 juega un papel importante en los efectos del endocannabinoides. (a) El bloqueo de IL-10 naciente mediante un anticuerpo específico Ac  $\alpha$ IL-10 (5 $\mu$ g/mL) produce una mayor síntesis de IL-12 inducida por LPS/IFN $\gamma$  y revierte parcialmente los efectos de AEA, indicando que la producción de esta citoquina participa en los mecanismos de acción del endocannabinoides sobre IL-12. \*\*\*p<0,001 vs. Control; \*\*p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \*p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) Un efecto similar, aunque de menor magnitud, se encuentra cuando se determinan los niveles de IL-23. \*\*\*p<0,001 vs. Control; \*\*p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; \*p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

IL-10 (10ng/mL) fue mayor sobre IL-12 que sobre IL-23. Esto sugiere una mayor sensibilidad de IL-12 a los efectos reguladores de IL-10, por lo que el papel autocrino de citoquina antiinflamatoria podrían ser más importantes sobre IL-12 que sobre IL-23.

Para comprobar la participación del receptor CB<sub>2</sub>, se realizó un experimento similar con el agonista selectivo JWH-133 (100nM), determinando los niveles de IL-12p40 (como una medida indirecta de ambas citoquinas) en los sobrenadantes de cultivos primarios de macrófagos. La figura 37 muestra que la neutralización de la IL-10 sintetizada *de novo* con un anticuerpo revierte los efectos de JWH-133 sobre esta citoquina, resaltando la participación del receptor CB<sub>2</sub>.



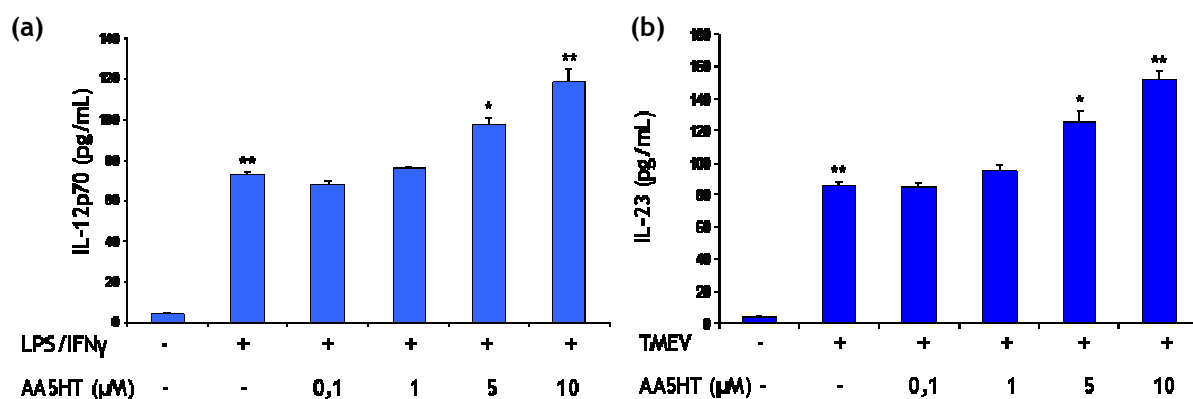
**Figura 37:** El bloqueo de la producción endógena de IL-10 revierte el efecto del agonista específico de CB<sub>2</sub>, JWH-133, sobre la producción de IL-12p40 por parte de macrófagos. El estímulo de cultivos primarios de macrófagos con LPS (50ng/mL) induce la síntesis de IL-12p40, la cual es revertida por el tratamiento con el agonista específico de CB<sub>2</sub>, JWH-133 (100nM). Cuando se bloquea la producción endógena de IL-10 con un anticuerpo específico αIL-10 (5μg/mL), se revierte parcialmente el efecto del JWH-133, confirmando la participación del receptor CB<sub>2</sub> en estos efectos. La administración de IL-10 (10ng/mL) revirtió la producción de IL-12p40 inducida por el LPS. \*p<0,001 vs. Control; #p<0,001 vs. LPS; Δp<0,02 vs. LPS; +p<0,05 vs. LPS+JWH133.

#### 4.4 El aumento del tono endógeno de AEA regula la expresión de IL-10.

Dado que la administración *in vitro* del inhibidor de la FAAH, el AA5HT, a cultivos primarios de microglía redujo la producción de IL-12 e IL-23 de una manera dependiente de la dosis, se decidió evaluar si este compuesto también era capaz de modular la producción de IL-10. Para ello se estimularon cultivos primarios de microglía con LPS/IFNγ (50ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) y mediante la infección *in vitro* con el virus de Theiler. En ambos casos, el aumento del tono endocannabinoide indujo un aumento de la producción de IL-10 (Fig. 38).

Estos resultados sugieren que la modulación del sistema cannabinoide endógeno es una diana potencialmente útil en la regulación de mediadores anti-inflamatorios, y por lo tanto del proceso inflamatorio en general.





**Figura 38:** La modulación del tono endocannabinoide mediante la inhibición de la enzima FAAH produce un aumento de la producción de IL-10 inducida por estímulos pro-inflamatorios. (a) La inhibición de FAAH con dosis crecientes de AA5HT produce un aumento en la producción de IL-10 inducida por el LPS/IFN $\gamma$  de una manera dependiente de la dosis. \*\* $p < 0,01$  vs. Control, vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) Un fenómeno similar se observa cuando se utiliza como estímulo pro-inflamatorio la infección con TMEV. \*\* $p < 0,01$  vs. Control, vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p < 0,05$  vs. LPS/IFN $\gamma$ .



## **5. Mecanismos independientes de receptores cannabinoides en la regulación de IL-12p40 por AEA.**



La microglía constituye una población de estirpe macrofágica residente en estructuras del SNC (cerebro, médula espinal y retina) y está morfológica, fenotípica y funcionalmente relacionada a células de estirpe mieloide (Aloisi y col., 1998; Stoll y Jander, 1999). La principal función de la microglía, tanto en condiciones normales como patológicas, es la de inmunovigilancia y de ser células accesorias/efectoras de la respuesta inmune. La microglía responde rápidamente a una serie de estímulos nocivos mediante cambios en su morfología, proliferación, expresión génica diferencial y cambio en el patrón de expresión de moléculas de superficie (Benveniste, 1997). Este patrón diferencial de expresión también se aplica al sistema endocannabinoide. Así, en un modelo de activación secuencial de microglía se observó que la expresión de CB<sub>1</sub> era constitutiva, mientras que la de CB<sub>2</sub> era inducible y variaba de acuerdo al grado de activación microglial, encontrándose niveles más bajos cuando la célula estaba completamente activada (Cabral y Marciano-Cabral, 2005). Por lo tanto parecería que la modulación de la respuesta microglial debida al receptor CB<sub>2</sub> estaría limitada a una ventana de activación celular, comprendiendo los estadios iniciales donde la expresión de CB<sub>2</sub> es mayor.

Por otro lado, numerosos estudios demuestran la capacidad de AEA de interaccionar con otros sistemas, enzimas y receptores, como el sistema vanilloide (Zygmunt y col., 1999), los receptores PPAR $\gamma$  (Bouaboula y col., 2005; O'Sullivan, 2007), ciertos canales iónicos como los canales de Ca<sup>2+</sup> de tipo T o los canales de K<sup>+</sup> Task-1 (Chemin y col., 2001) y con la enzima COX-2 (revisado por Fowler, 2007).

Dados estos antecedentes, se decidió evaluar cómo se comportaban los componentes del sistema endocannabinoide en situaciones de activación microglial y si AEA podría estar ejerciendo algunos de sus efectos por mecanismos independientes de receptor.

### 5.1 Modificación de los niveles de CB<sub>2</sub> en microglía activada.

Como primer paso para evaluar el comportamiento de componentes del sistema endocannabinoide en situaciones de activación microglial, se determinaron los niveles del ARN mensajero de CB<sub>2</sub> a dos tiempos post-estímulo: 8 y 18 horas. La figura 39a muestra que ya a las 8hs post-estímulo con LPS/IFN $\gamma$ , los niveles de CB<sub>2</sub> son significativamente menores que en las células “en reposo”. Esta disminución se mantuvo hasta las 18hs post-estímulo (Fig. 39b).

A continuación se analizó si el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  a distintos tiempos modificaba los niveles de expresión de la principal enzima degradativa de AEA, la FAAH. Se determinaron asimismo los niveles de COX-2, enzima inducible, como medida de la activación microglial. Como se observa en la figura 39c, los niveles de FAAH se mantuvieron

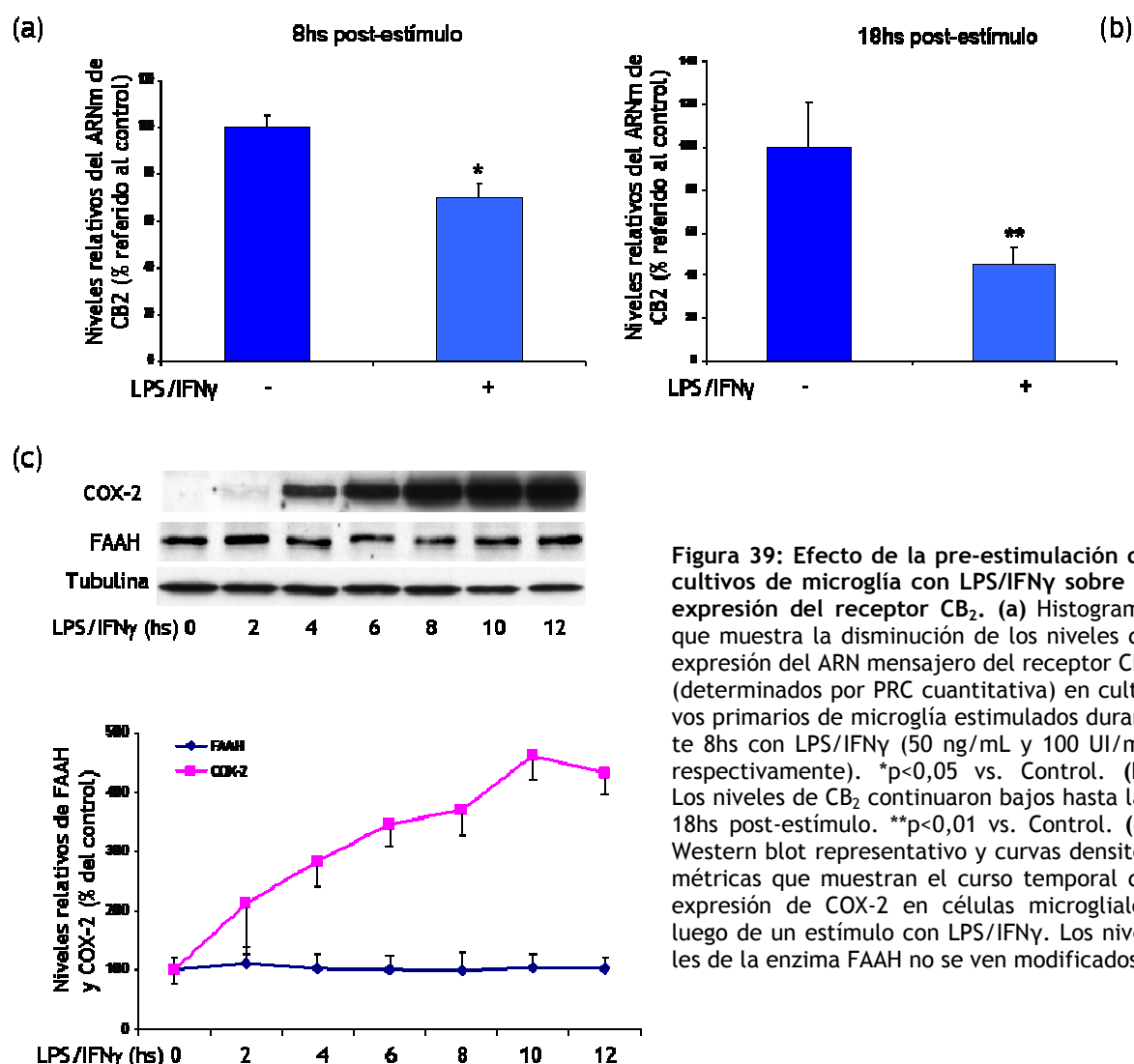


Figura 39: Efecto de la pre-estimulación de cultivos de microglía con LPS/IFN $\gamma$  sobre la expresión del receptor CB<sub>2</sub>. (a) Histograma que muestra la disminución de los niveles de expresión del ARN mensajero del receptor CB<sub>2</sub> (determinados por PRC cuantitativa) en cultivos primarios de microglía estimulados durante 8hs con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente). \* $p < 0,05$  vs. Control. (b) Los niveles de CB<sub>2</sub> continuaron bajos hasta las 18hs post-estímulo. \*\* $p < 0,01$  vs. Control. (c) Western blot representativo y curvas densitométricas que muestran el curso temporal de expresión de COX-2 en células microgliales luego de un estímulo con LPS/IFN $\gamma$ . Los niveles de la enzima FAAH no se ven modificados.

constantes durante todo el tiempo, mientras que a las 2hs post-estímulo, los niveles de COX-2 estaban ligeramente aumentados y continuaban incrementándose en el tiempo al menos hasta las 12 horas post-estímulo.

Dado que a 8 horas post-estimulación los niveles de CB<sub>2</sub> disminuyen y que, cuando se co-administraba AEA con el estímulo, este receptor estaba involucrado en los efectos del endocannabinoide, se estudió si AEA era capaz de regular la expresión de IL-12p40 (como medida indirecta de ambas citoquinas) en células que hubieran recibido un pretratamiento ("priming") con LPS/IFN $\gamma$  8 horas antes (y por lo tanto tuvieran una menor expresión de CB<sub>2</sub>). Se realizaron dos experimentos en paralelo: en un caso se administró AEA al mismo tiempo que el estímulo de LPS/IFN $\gamma$  y en el otro caso se realizó un pre-estímulo de 8hs con LPS/IFN $\gamma$ , pasado ese tiempo se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se trataron las células con AEA. La figura 40a muestra que cuando se administra AEA al mismo tiempo que el estímulo pro-inflamatorio, la regulación a la baja de IL-12p40 está

mediada por el receptor CB<sub>2</sub> ya que al antagonizar al mismo con el SR2, este efecto es revertido. Por el contrario, cuando se tratan a las células con AEA 8hs después del estímulo pro-inflamatorio, el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> carece de efectos sobre la regulación de los niveles de IL-12p40 (Fig. 40b). Aunque cabe destacar que en este caso la capacidad de AEA de revertir la producción de IL-12p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$  fue algo menor.

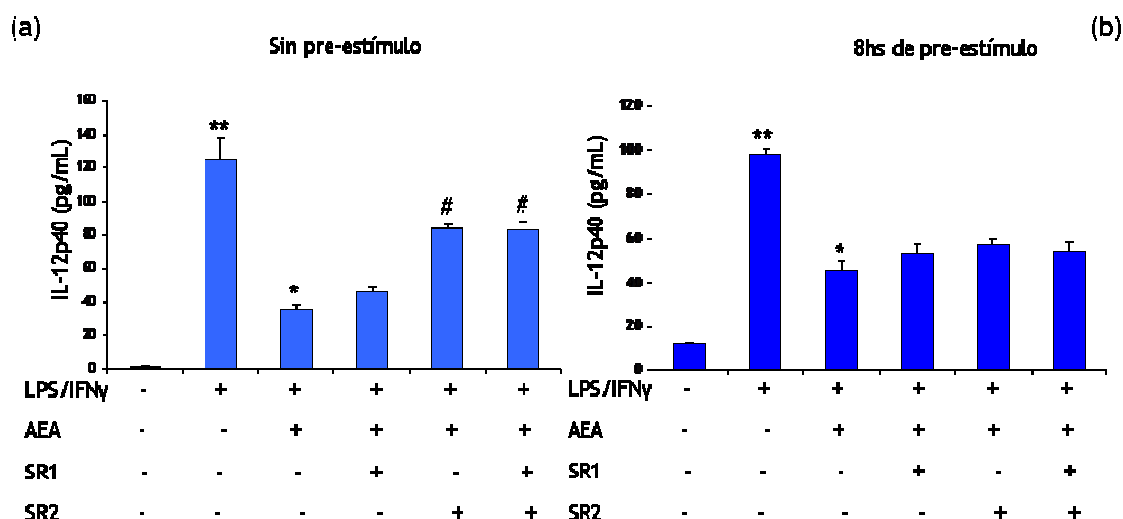


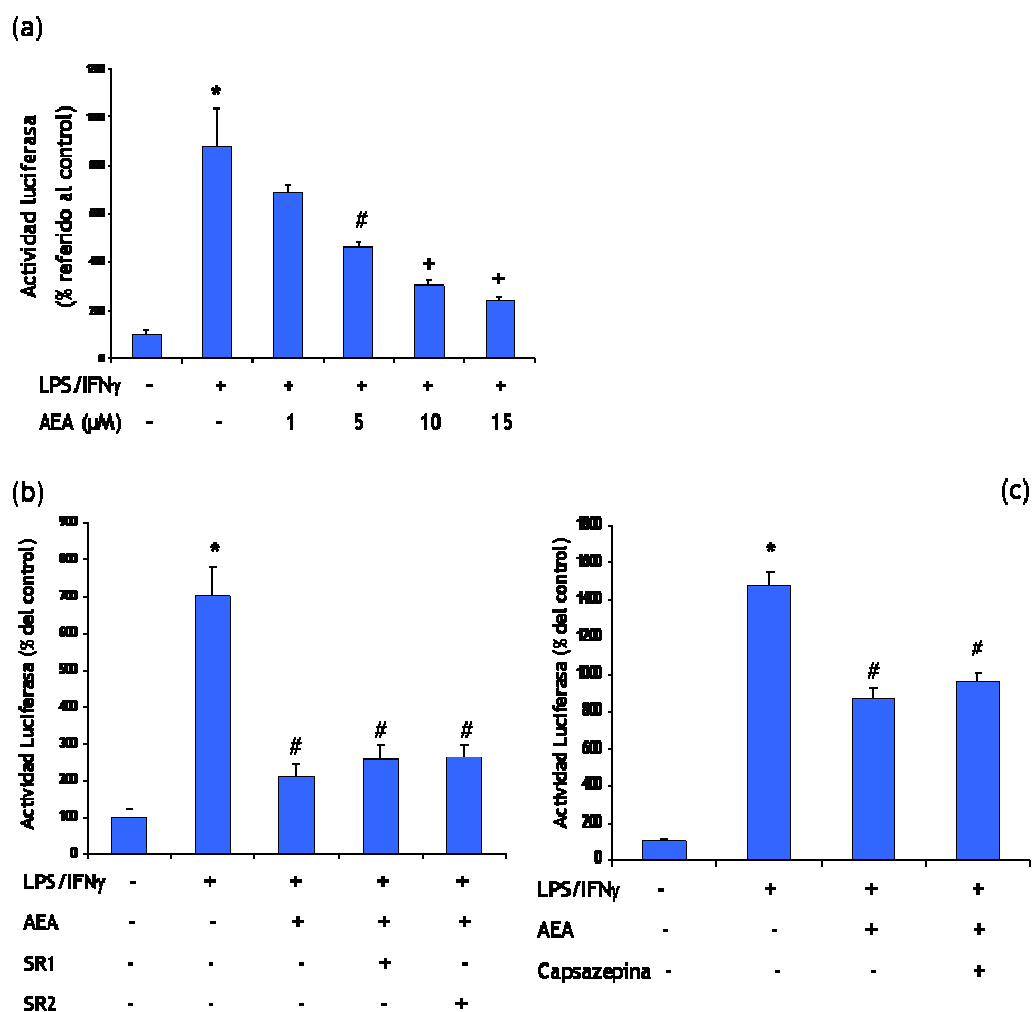
Figura 40: AEA ejerce sus efectos sobre la producción de IL-12p40 por mecanismos dependientes o independientes de receptor CB<sub>2</sub> dependiendo del estado de activación celular. (a) El co-tratamiento de AEA (10 $\mu$ ) con LPS/IFN $\gamma$  modula a la baja la expresión de IL-12p40, determinada por ELISA en los sobrenadantes de cultivos de microglía. Este efecto es revertido por el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> con el antagonista específico SR2 (1 $\mu$ M), mientras que el antagonismo del receptor CB<sub>1</sub> no produce ningún efecto. \*\*p<0,01 vs. Control; \*p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA. (b) Sin embargo, cuando se tratan con AEA (10 $\mu$ M) cultivos de microglía previamente estimulados durante 8hs con LPS/IFN $\gamma$ , el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> es incapaz de revertir los efectos de AEA sobre la síntesis de IL-12p40. Esto indica que en estas condiciones efecto de AEA es independiente de la activación del receptor CB<sub>2</sub>. \*\*p<0,01 vs. Control; \*p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$

## 5.2 AEA reduce la actividad del promotor de IL-12p40 mediante la activación del elemento represor GA-12 por un mecanismo independiente de receptores cannabinoides y vanilloides.

De los resultados anteriores se desprende que bajo determinadas condiciones AEA puede regular la expresión de la subunidad p40 mediante mecanismos independientes de receptores cannabinoides. En un intento de dilucidar estos mecanismos, se decidió estudiar la regulación de IL-12p40 a nivel de promotor. Para ello se utilizó la línea celular de macrófagos RAW264.7, muy bien caracterizada y ampliamente utilizada en el estudio de la regulación de la actividad del promotor de p40 (Plevy y col., 1997; Becker y col., 2001; Luo y col., 2004).

Con este fin se utilizó un plásmido reportero, en el cual la secuencia del promotor silvestre de IL-12p40 está acoplado al gen de la luciferasa, de tal manera que la activa-

ción del promotor puede cuantificarse en términos de la actividad enzimática de la luciferasa por luminometría (Becker y col., 2001). Se transfectaron transientemente células RAW264.7 con esta construcción y se estimularon las células con LPS/IFN $\gamma$  que provocó un gran aumento en la actividad transcripcional, la cual fue revertida por el tratamiento con AEA a diferentes dosis (Fig. 41a). El tratamiento sólo con AEA careció de efectos sobre la actividad del promotor de IL-12p40. Una vez establecido que AEA regula la expresión de p40 a nivel del promotor, se decidió explorar si estos efectos podrían estar mediados por receptores cannabinoides. Para ello se repitió el experimento en presencia de los antago-



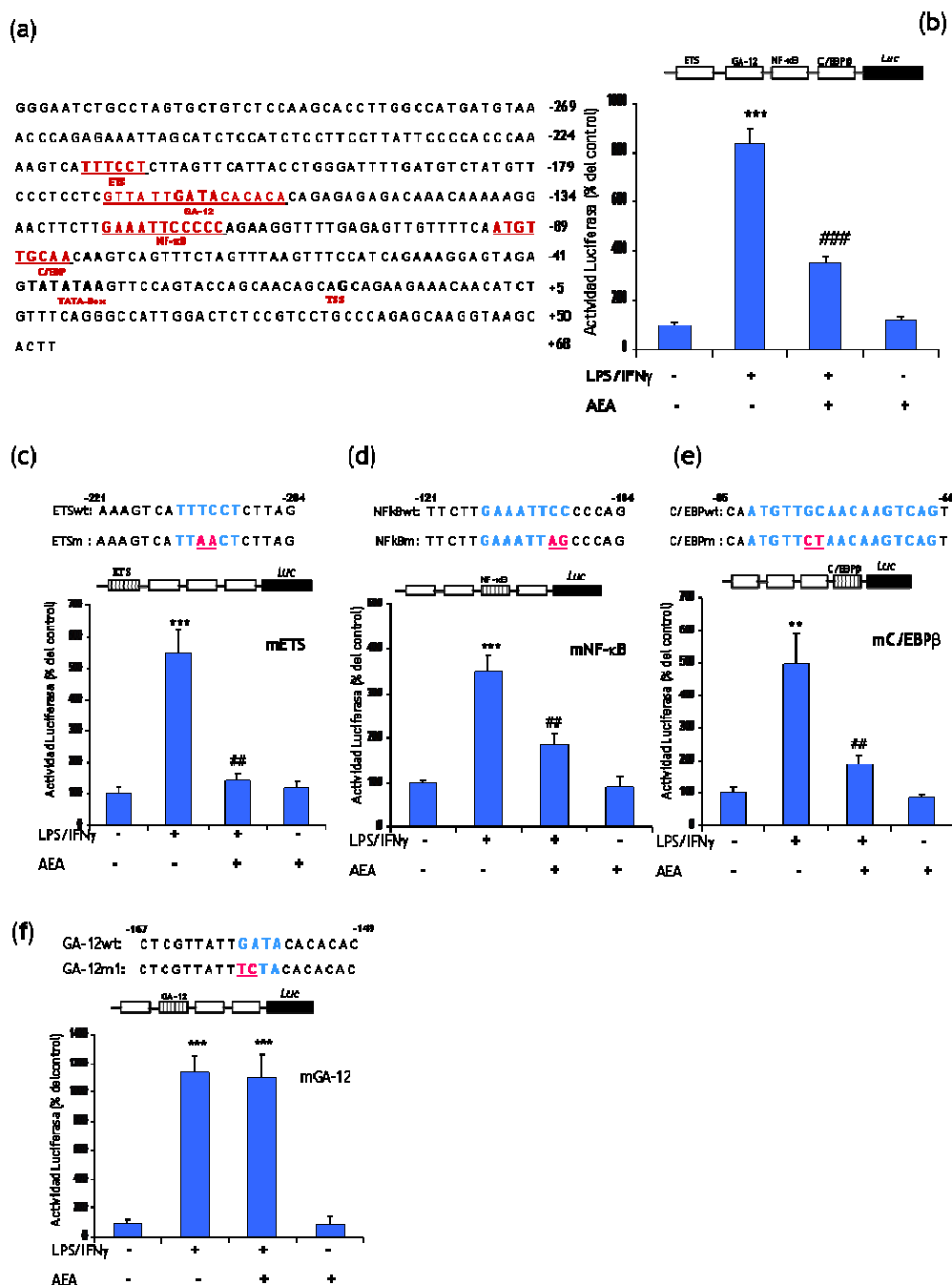
**Figura 41: AEA regula la actividad del promotor de IL-12p40 por un mecanismo independiente de receptores cannabinoides y vanilloides.** (a) Histograma que representa los niveles de actividad luciferasa en respuesta a los distintos tratamientos que fueron sometidas las células RAW264.7 transfectadas transientemente con el plásmido pGL2B que contiene la secuencia silvestre del promotor de p40 acoplado al gen reportero de la luciferasa. El estímulo con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) aumenta la activada del promotor de IL-12p40, la cual es modulada a la baja por distintas dosis de AEA (10 $\mu$ ). \* $p$ <0,02 vs. Control; # $p$ <0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; + $p$ <0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) Histograma que representa los niveles de actividad luciferasa en respuesta a distintos tratamientos. Ni el antagonismo del receptor CB $_1$  con SR1 (1 $\mu$ M) ni el del receptor CB $_2$  (1 $\mu$ M) revierten los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40. \* $p$ <0,005 vs. Control; # $p$ <0,002 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (c) El antagonismo del receptor vanilloide VR1 con capsazepina (10 $\mu$ M) es incapaz de revertir los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40, indicando que sus efectos son independientes tanto de receptores cannabinoides como vanilloides. \* $p$ <0,001 vs. Control; # $p$ <0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ .



nistas SR1 y SR2 respectivamente. Como se muestra en la figura 41b, ninguno de los dos antagonistas fue capaz de revertir los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40. Dado que varios estudios demuestran que AEA puede comportarse como un agonista completo del receptor vanilloide TRPV<sub>1</sub> (Zygmunt y col., 1999), se evaluó si este podría estar modulando la actividad del promotor de IL-12p40. Para ello se trataron las células RWA264.7 transfectadas con el antagonista de TRPV<sub>1</sub>, la capzasepina (10μM), previo al estímulo con LPS/IFNγ y al tratamiento con AEA. La figura 41c muestra que el pretratamiento con capzasepina fue incapaz de prevenir los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de p40.

Diversos estudios demuestran que el promotor de IL-12p40 contiene varios sitios de unión a factores de transcripción que contribuyen a la regulación de la actividad del mismo. Los tres elementos de control activadores que han sido mejor caracterizados son los que se unen a los factores transcripción NF-κB, C/EBPβ y ETS. Además se ha descrito un elemento de control represor denominado GA-12, por unirse a la secuencia GATA del promotor de IL-12p40 (Becker y col., 2001) (Fig. 42a y 42b). Con el fin de investigar los mecanismos moleculares que controlan los efectos de AEA sobre la actividad transcripcional de IL-12p40, se realizaron una serie de experimentos con construcciones que portaban una mutación puntual de dos pares de base en los elementos de control del promotor de p40. Becker y col. (2001) han demostrado que las construcciones que llevan estas mutaciones poseen una menor capacidad de activarse en respuesta a LPS/IFNγ. La mutagénesis específica de sitio de los elementos C/EBPβ, NF-κB y ETS fue incapaz de revertir los efectos inhibidores de AEA sobre la actividad del promotor de p40 (Fig. 42c, 42d y 42e). Sin embargo, cuando se mutaba la secuencia del represor GA-12, AEA era incapaz de revertir la inducción provocada por LPS/IFNγ (Fig. 42f), indicando que el principal mecanismo de acción de AEA es la activación del sitio represor en el promotor de IL-12p40.

En un intento por confirmar este hallazgo, se realizaron experimentos utilizando el ensayo de oligonucleótidos señuelo (“decoy oligonucleotide assay”). El experimento consiste en que los oligonucleótidos señuelo competirán con la secuencia génica por los factores de transcripción activados (sean activadores o represores), de manera tal que si los oligos señuelo “secuestran” una proteína (o complejo de proteínas) activadora, se espera que la actividad transcripcional disminuya; si la proteína secuestrada es un represor, se espera encontrar que la actividad transcripcional aumente. Se generaron, entonces, oligonucleótidos de doble cadena con la secuencia del represor GA-12 y se transfectaron células RAW264.7 con los mismos. El uso de oligonucleótidos señuelo bloqueó completamente el efecto de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40 (Fig. 43). Para confirmar que este efecto era específico de la secuencia del señuelo, se utilizó como control otro



**Figura 42: AEA reduce la actividad del promotor de IL-12p40 mediante la activación del sitio represor GA-12.** (a) Esquema de los sitios de unión consenso del promotor ubicados entre las -300 y +68 pares de bases del gen de IL-12p40. (b) Histogramas que muestran los niveles de actividad luciferasa en respuesta a los distintos tratamientos. Se transfectaron transcientemente células RAW264.7 con el plásmido pXP1 que contiene la secuencia silvestre del promotor de p40 acoplado al gen reportero de la luciferasa (p40/pXP1) y se trataron las células con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) en presencia o ausencia de AEA (10 $\mu$ M). EL tratamiento con el cannabinoide revierte el aumento de la actividad del promotor de p40 inducida por el estímulo pro-inflamatorio. \*\*\*p<0,001 vs. Control; ###p<0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (c) (d) y (e) Histogramas que muestran los niveles de actividad luciferasa en respuesta a los distintos tratamientos en células RAW264.7 transfectadas transcientemente con vectores mutantes p40/pXP1 que contienen mutaciones puntuales de dos pares de base en los sitios ETS, NF $\kappa$ B y C/EBP $\beta$  (indicados en rojo y subrayados). En los tres casos la inducción de la actividad del promotor fue menor que la del promotor silvestre. Sin embargo en ningún caso la mutación fue capaz de interferir con el efecto de AEA de reducir la inducción causada por el estímulo con LPS/IFN $\gamma$ . (c) \*\*\*p<0,001 vs. Control; ##p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) \*\*\*p<0,001 vs. Control; ##p<0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (e) \*\*p<0,002 vs. Control; \*\*p<0,002 vs. Control; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (f) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transcientemente con el vector p40/pXP1 que contiene una mutación en el sitio GA-12. La mutación en esta región interfiere completamente con el efecto de AEA. \*\*\*p<0,001 vs. Control.

oligo señuelo que llevaba una mutación puntual de dos pares de bases en la secuencia GA-TA. El oligonucleótido mutado fue incapaz de revertir los efectos de AEA en la regulación a la baja de la actividad del promotor de IL-12p40. Estos hallazgos apoyan la hipótesis de que AEA actúa disminuyendo la expresión de p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$  principalmente actuando sobre el sitio represor GA-12.

(a)

Decoy GA-12 wild type: "CTCTTTATTGATACACACACAGAGA"  
(dGA-12 wt)

Decoy GA-12m: "CTCTTTATTCTACACACACAGAGA"  
(dGA-12m)

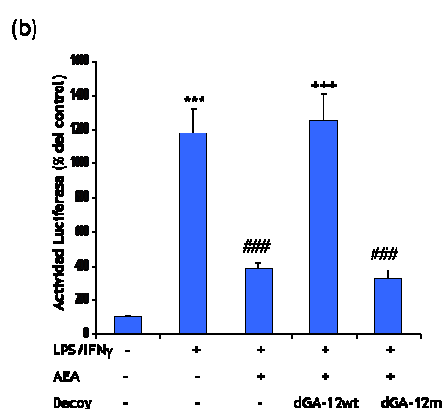
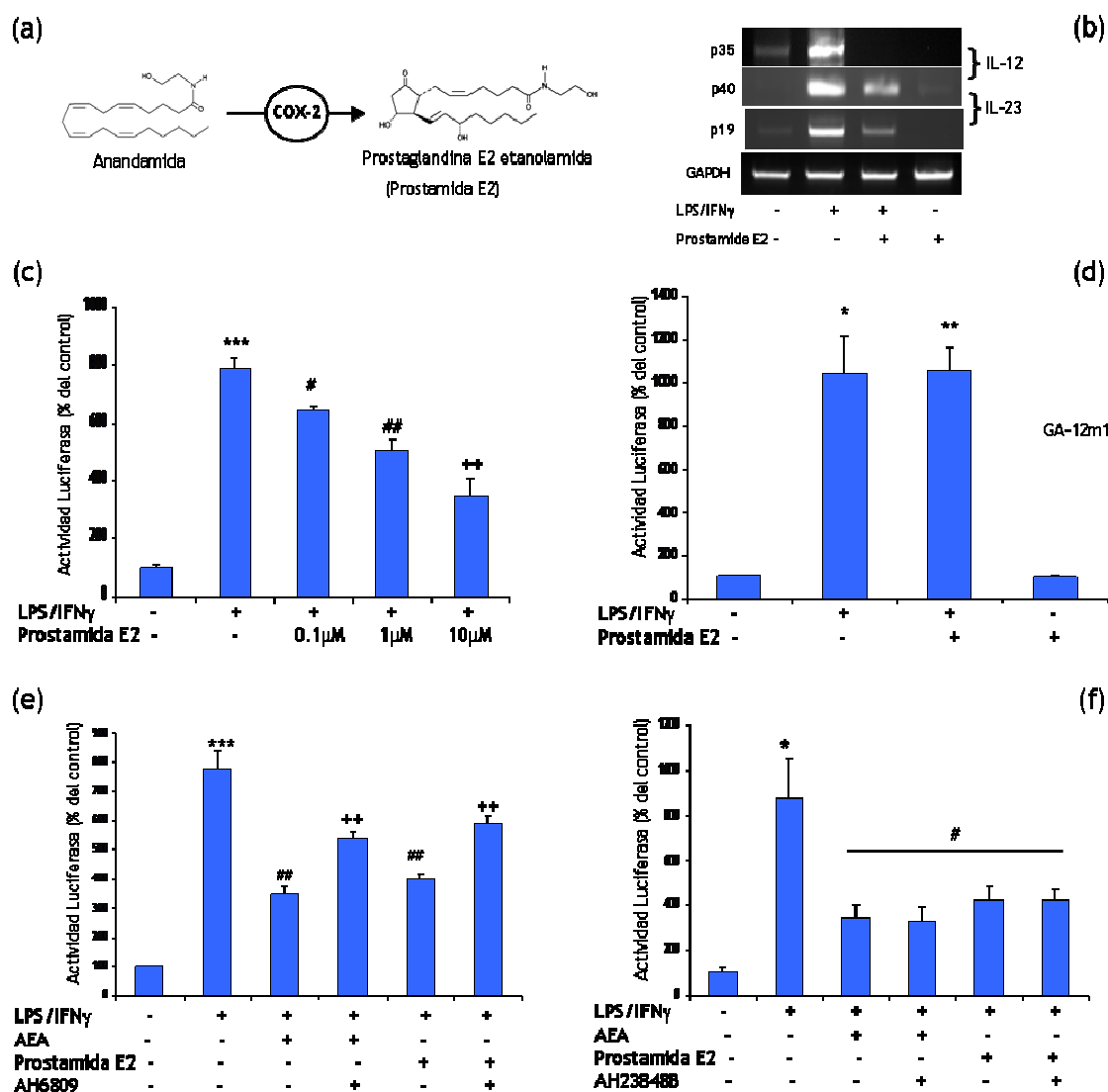


Figura 43: El oligonucleótido señuelo de GA-12 silvestre revierte los efectos de AEA sobre la activación del sitio represor GA-12 del promotor de p40. (a) Secuencia de los oligonucleótidos señuelo GA-12 silvestre (dGA-12wt) y GA-12 mutado (dGA-12m) utilizados. (b) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transientemente con el vector p40/pXP1 silvestre junto con los oligonucleótidos señuelo (silvestre o mutado). La co-transfección del oligonucleótido señuelo dGA-12m con el vector p40/XP1 bloquea completamente los efectos de AEA de reducción de la actividad del promotor de p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$ , mientras que la co-transfección de dGA-12wt con p40/pXP1 no tuvo ningún efecto. \*\*\*p<0,001 vs. Control; ###p<0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ , +++p<0,001 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA.

### 5.3 Interacciones entre AEA y COX-2: inhibición de la actividad del promotor de IL-12p40 por prostamida E<sub>2</sub> y participación del receptor prostanoide EP2.

Los resultados hasta ahora descritos muestran que el efecto inhibitorio de AEA sobre la regulación del promotor de IL-12p40 en este sistema es independiente de receptores cannabinoides y vanilloides. Varios estudios recientes señalan la capacidad de COX-2 de oxigenar a endocannabinoides para generar una serie de compuestos muy relacionados con las prostaglandinas (Matias y col., 2004; Glass y col., 2005). De esta manera, AEA puede ser sustrato de COX-2, sobre todo en condiciones de inflamación donde esta enzima está altamente expresada, para generar una prostaglandina etanolamida, siendo la más abundante la prostamida E<sub>2</sub> (Ross y col., 2002) (Fig. 44a). En una primera aproximación se investigó los efectos de prostamida E<sub>2</sub> sobre la regulación de IL-12p40. Así, se analizó el efecto de este compuesto sobre los niveles de los ARN mensajeros de p40, p35 y p19 inducidos por el estímulo con LPS/IFN $\gamma$  en cultivos primarios de microglía. Como muestra la figura 44b, el tratamiento con prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) revirtió marcadamente el aumento de expresión del mensajero de las subunidades inducido por LPS/IFN $\gamma$ . Posterior-

mente se procedió a evaluar el efecto de prostamida E<sub>2</sub> sobre la actividad del promotor de IL-12p40, realizándose para ello, una curva dosis-respuesta (0,1  $\mu$ M; 1 $\mu$ M; 10 $\mu$ M). Efectivamente, prostamida E<sub>2</sub> inhibió la actividad del promotor de p40 de una manera depen-



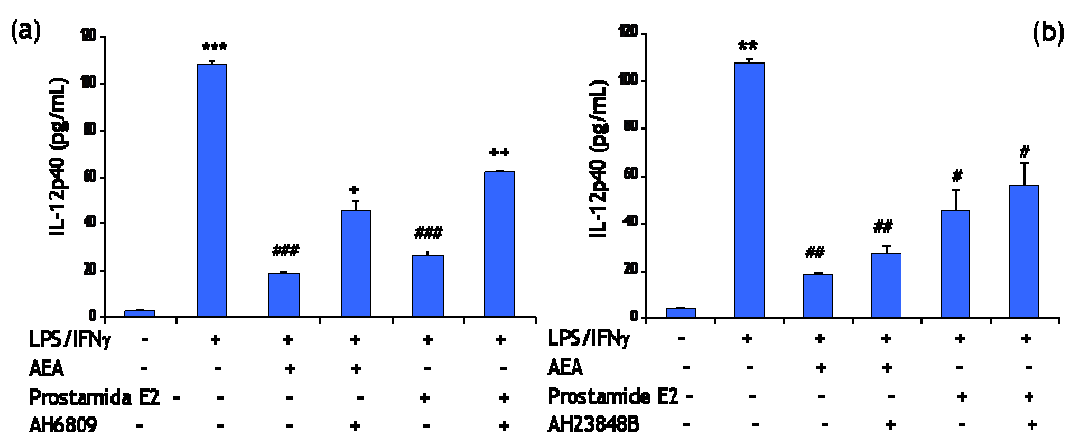
**Figura 44:** Prostamida E<sub>2</sub> reduce la actividad del promotor de IL-12p40 al actuar sobre el sitio represor GA-12: participación del receptor EP2. (a) Esquema que muestra la vía metabólica por la cual AEA se convierte en prostamida E<sub>2</sub>. (b) Las células microgliales estimuladas con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) muestran un incremento en la expresión de los ARN mensajeros de p35, p40 y p19, determinado por RT-PCR. El co-tratamiento con prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) reduce dicha inducción. (c) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transientemente con el vector p40/pGL2B y sometidas a un estímulo con LPS/IFN $\gamma$  en presencia o ausencia de distintas dosis de prostamida E<sub>2</sub>. Prostamida E<sub>2</sub> moduló a la baja la actividad del promotor de p40 de forma dosis-dependiente. \*\*\*p<0,0001 vs. Control; #p<0,02 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ##p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ++p<0,005 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (d) Actividad luciferasa de células RAW264.7 co-transfectadas transientemente con el vector p40/pXP1 silvestre en presencia del oligonucleótido señuelo dGA-12m. La co-transfección del oligonucleótido bloquea completamente el efecto de prostamida E<sub>2</sub> de disminuir la magnitud de la inducción de la actividad del promotor de p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$ . \*\*p<0,001 vs. Control; \*p<0,01 vs. Control. (e) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transientemente con el vector p40/XP1 y tratadas con LPS/IFN $\gamma$ , AEA (10 $\mu$ M), prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en presencia o ausencia del antagonista de receptores EP2, AH6809 (10 $\mu$ M). El antagonismo de receptores EP2 revierte los efectos tanto de AEA como de prostamida E<sub>2</sub>. \*\*\*p<0,001 vs. Control; ##p<0,03 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; ++p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA y vs. LPS/IFN $\gamma$ +prostamida E<sub>2</sub>. (f) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transientemente con el vector p40 y tratadas con LPS/IFN $\gamma$ , AEA (10 $\mu$ M), prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en presencia o ausencia del antagonista de receptores EP4, AH23848B (30 $\mu$ M). El antagonismo de receptores EP4 no modifica los efectos de AEA ni de prostamida E<sub>2</sub> sobre la actividad del promotor de p40. \*p<0,02 vs. Control; #p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

diente de la dosis (Fig. 44c).

Dado que prostamida E<sub>2</sub> es capaz de regular la actividad del promotor de IL-12p40, se planteó como objetivo estudiar si este compuesto, al igual que AEA, actúa sobre el sitio represor GA-12. Para ello se transfectaron células RAW264.7 con la construcción mutante de GA-12 y se trataron las células con prostamida E<sub>2</sub> (10μM), la cual fue incapaz de revertir la inducción de la actividad del promotor de p40 (Fig. 44d). Estos datos sugieren que prostamida E<sub>2</sub> actúa también sobre el sitio represor GA-12.

Como prostamida E<sub>2</sub> es muy similar estructuralmente a prostaglandina-E<sub>2</sub> y las células de estirpe mieloide expresan los diferentes subtipos de receptores prostanoideos, se decidió explorar la posibilidad de que los efectos inhibitorios de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40 estuvieran mediados por la generación de prostamida E<sub>2</sub>. Para ello se utilizó una aproximación farmacológica con el antagonista del receptor prostanoide EP2, el AH6809, que es activado por prostamida E<sub>2</sub> (Matias y col., 2004). Se transfectaron células RAW264.7 y se las trató con AEA o prostamida E<sub>2</sub>, en presencia o ausencia de AH6809 (10μM), previo estímulo con LPS/IFNγ. Como se muestra en la figura 44e, el tratamiento con AH6809 revirtió parcialmente el efecto inhibitorio tanto de AEA como de prostamida E<sub>2</sub> sobre la actividad del promotor de IL-12p40. Estos datos sugieren que parte de los efectos de AEA están mediados por la activación del receptor prostanoide EP2.

Por otro lado, se evaluó la posible participación del receptor EP4 mediante el uso del antagonista específico AH23848B. Para ello se realizó un experimento similar al des-

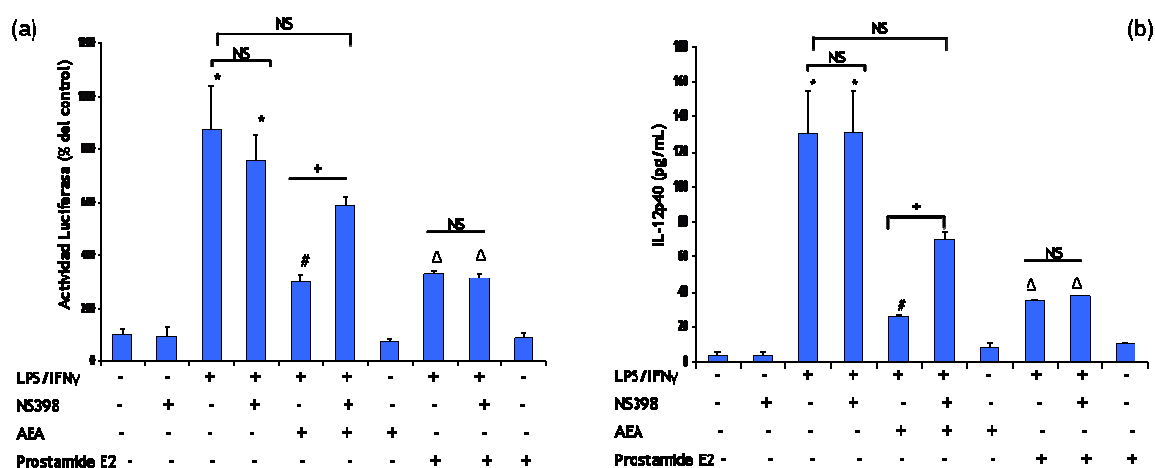


**Figura 45: Prostamida E<sub>2</sub> regula negativamente la síntesis de IL-12p40 en células microgliales activadas.** (a) Cultivos de microglía fueron pre-estimulados con LPS/IFNγ (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) durante 8hs para luego ser tratados con AEA (10μM) y/o prostamida E<sub>2</sub> (10μM) en presencia o ausencia del antagonista EP2, AH6809 (10μM). El antagonismo del receptor EP2 bloqueó parcialmente los efectos tanto de AEA como de prostamida E<sub>2</sub> sobre la síntesis de IL-12p40, determinada por ELISA en los sobrenadantes de los cultivos. \*\*\*p<0,001 vs. Control; ###p<0,001 vs. LPS/IFNγ; +p<0,05 vs. LPS/IFNγ+AEA; ++p<0,005 vs. LPS/IFNγ vs. LPS/IFNγ+prostamide E<sub>2</sub>. (b) Cuando se realizó un experimento similar, esta vez en presencia o ausencia del antagonista del receptor EP4, AH23848B (30μM), los niveles de producción de IL-12p40 no se vieron modificados. Por lo tanto, las acciones de AEA y prostamide E<sub>2</sub> no estarían mediadas por la activación del receptor EP4. \*\*p<0,002 vs. Control; ##p<0,005 vs. LPS/IFNγ; #p<0,05 vs. LPS/IFNγ.

crito más arriba. Sin embargo, el antagonismo del receptor EP4 con AH23848B (30 $\mu$ M) fue capaz de revertir los efectos de AEA y de prostamida E<sub>2</sub> (Fig. 44f).

Estando establecido que tanto AEA como prostamida E<sub>2</sub> regulan la actividad del promotor de p40 vía el receptor EP2, se procedió a estudiar si el mismo mecanismo estaba mediando la regulación de la expresión proteica de IL-12p40 por AEA. Para ello se procedió a pre-estimular cultivos de microglía durante 8hs con LPS/IFN $\gamma$ . Pasado ese tiempo, se cambió el medio de cultivo por medio fresco y se realizaron los tratamientos correspondientes y se determinaron los niveles proteicos de IL-12p40 en los sobrenadantes de los cultivos mediante ELISAs. Cuando se antagonizó al receptor EP2 con el compuesto AH6809 (10 $\mu$ M), los efectos de AEA y de prostamida E sobre la expresión de IL-12p40 fueron revertidos parcialmente (Fig. 45a), mientras que cuando se antagonizó el receptor EP4 con el compuesto AH23848B (30 $\mu$ M), no hubo modificaciones en los efectos de AEA ni en los de prostamida E<sub>2</sub> (Fig. 45b).

Dado que tanto AEA como prostamida E<sub>2</sub> regulan la expresión de IL-12p40 a nivel proteico y del promotor, y teniendo en cuenta que AEA puede ser oxigenada por COX-2 para generar prostamidas, se procedió a evaluar si la inhibición de la actividad enzimática de COX-2 podría resultar en una reversión de los efectos de AEA sobre el promotor de IL-12p40 y/o de la proteína. Para ello se utilizó el inhibidor específico de COX-2, el NS-398 (10 $\mu$ M). Las células RAW264.7 tratadas con NS-398 mostraron una significativa reversión



**Figura 46:** La inhibición farmacológica de COX-2 revierte los efectos de AEA tanto a nivel del promotor como de la síntesis de la proteína. (a) Actividad luciferasa de células RAW264.7 transfectadas transientemente con el vector p40/pGL2B y sometidas a una pre-estimulación de 8 hs. con LPS/IFN $\gamma$  (50 ng/mL y 100 UI/mL respectivamente) para luego ser tratadas con AEA (10 $\mu$ M), prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en presencia o ausencia del inhibidor específico de la enzima COX-2, NS-398 (10M). La inhibición de COX-2 revirtió los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de p40 mientras que no modificó los efectos de prostamida E<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs. Control; #p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; +p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA;  $\Delta$ p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ . (b) Niveles de la proteína IL-12p40 determinados por ELISA en sobrenadantes de cultivos microgliales pre-estimulados 8hs con LPS/IFN $\gamma$ . Pasado ese tiempo las células se trataron con AEA (10 $\mu$ M), prostamida E<sub>2</sub> (10 $\mu$ M) en presencia o ausencia del inhibidor específico de la enzima COX-2, NS-398 (10M). La inhibición de COX-2 revirtió los efectos de AEA sobre la producción proteica de IL-12p40 mientras que no modificó los efectos de prostamida E<sub>2</sub>. \*p<0,05 vs. Control; #p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ ; +p<0,05 vs. LPS/IFN $\gamma$ +AEA;  $\Delta$ p<0,01 vs. LPS/IFN $\gamma$ .

de los efectos de AEA sobre la actividad del promotor de IL-12p40 (Fig. 46a). El tratamiento con NS-398 solo no modificó los niveles basales ni afectó a los niveles inducidos por el estímulo con LPS/IFN $\gamma$ , indicando que se trata de un efecto específico sobre la actividad de AEA. Asimismo, NS-398 fue incapaz de revertir los efectos de prostamida E<sub>2</sub> sobre la actividad del promotor de IL-12p40, dado que este es un metabolito ubicado corriente abajo de COX-2. De igual manera, cuando se determinaron los niveles de proteína presente en los sobrenadantes de células microgliales pre-estimuladas durante 8hs con LPS/IFN $\gamma$ , la inhibición de COX-2 con NS-398 (10 $\mu$ M) revirtió los efectos de AEA sin afectar al tratamiento con prostamida E<sub>2</sub> ni tener efectos por sí solo ni modificar los niveles inducidos por el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  (Fig. 46b). Estos resultados, similares a los hallados con el promotor de IL-12p40 sugieren que, en condiciones donde COX-2 está presente, esta enzima puede contribuir a las acciones de AEA.





## Discusión



## 1. Los cannabinoides modulan el proceso inflamatorio en patologías del SNC.

La esclerosis múltiple se define actualmente como una patología crónica inflamatoria desmielinizante del SNC. Las lesiones de EM son heterogéneas y se caracterizan por inflamación, desmielinización y grados variables de pérdida axonal; lo que lleva a que las manifestaciones clínicas de las lesiones neuropatológicas sean complejas y variables (Lassmann, 1998).

La inoculación intracraneal de cepas susceptibles de ratón con el virus de Theiler induce una enfermedad inflamatoria crónica desmielinizante del SNC que puede eventualmente causar la muerte del animal (Dal Canto y Lipton, 1982). Dicho proceso inflamatorio cursa con extensas lesiones desmielinizantes de la sustancia blanca (Rodríguez y col., 1991) e infiltrado perivascular de células mononucleares en la médula espinal (fundamentalmente linfocitos T CD4<sup>+</sup> y CD8<sup>+</sup>, algunos monocitos, macrófagos, linfocitos B y en menor grado, células plasmáticas) (Pope y col., 1996; Drescher y col., 1997; Begolka y col., 1998; Murria y col., 1998). La desmielinización crónica lleva a una progresiva atrofia de la médula espinal, muerte de oligodendrocitos, daño axonal (McGavern y col., 2000; Kim y col., 2001) y remielinización incompleta (McGavern y col., 1999). Todos estos procesos conllevan a un deterioro neurológico con disrupción de la coordinación motora, parálisis de las patas traseras, espasticidad, ataxia e incontinencia (Lipton y Dal Canto, 1976; Oleszak y col., 2004). Esta enfermedad desmielinizante inducida por el virus de Theiler (TMEV-IDD) se ha considerado un excelente modelo experimental para el estudio de la esclerosis múltiple progresiva primaria y secundaria debido a las similitudes neuropatológicas con las que ambos procesos cursan (Oleszak y col., 2004). Además, el modelo de Theiler tiene en cuenta factores genéticos (cepa susceptible) y ambientales (hipótesis de la etiología viral de la EM) que parecen estar involucrados en el desarrollo de dicha patología desmielinizante.

Así, dado el componente inmuno-inflamatorio de la EM, la mayoría de las estrategias terapéuticas para el tratamiento de pacientes con EM se basan en la modulación de la respuesta inmune mediante la administración de compuestos inmunomoduladores, como el IFN $\beta$  o inmunosupresoras, como el Mitoxantrón, Azatioprina o Ciclofosfamida (Neuhaus y col., 2003). Sin embargo, el tratamiento a largo plazo posee la complicación del desarrollo de anticuerpos frente a estas moléculas (Weinstock-Guttman y Jacobs, 2000; Dubois y col., 2003). Otras estrategias inmunomoduladoras y/o antiinflamatorias, que han demostrado tener cierto éxito terapéutico, utilizan anticuerpos poliespecíficos (Strasser-Fuchs y col., 2000; Sorensen y col., 2002). Estos anticuerpos inducirían la supresión de células T (Aktas y col., 2001), disminuirían la endocitosis de la proteína básica de mielina

(MBP) (Stangel y col., 2000a) y protegerían a los oligodendrocitos del daño por el complemento (Stangel y col., 2000b). Sin embargo, la necesidad de obtener anticuerpos humanizados para evitar la reacción inmunológica contra ellos y el coste asociado, hace que este tipo de terapias sea prohibitivo desde el punto de vista económico para muchos pacientes.

En este sentido, y dadas sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras, los cannabinoides se ofrecen como una alternativa terapéutica viable a las patologías que cursan con procesos inflamatorios crónicos (Pertwee y col., 2002; Baker y col., 2003; Croxford, 2003; Pryce y Baker, 2005). Así, los cannabinoides han demostrado ser de utilidad terapéutica en distintos modelos animales de EM (Walter y Stella, 2004). Lyman y col., (1989) realizaron experimentos con ratas a las cuales administraban THC ya sea unos días antes de generar la EAE o bien unos días después de que ésta se hubiera desarrollado. En el caso de las ratas administradas con THC antes de la generación de la EAE, el desarrollo de la misma fue prevenido, lo que llevó a los autores a sugerir que THC había evitado la activación del sistema inmune (Lyman y col., 1989). En el caso de las ratas tratadas con THC una vez desarrollada la EAE, el índice de las manifestaciones clínicas de la misma se encontraba reducido. Estas observaciones macroscópicas coincidían con los hallazgos histológicos obtenidos de cortes de la médula espinal de dichas ratas. (Lyman y col., 1989). Otros trabajos se enfocaron en el tratamiento agudo de cannabinoides y sus efectos sobre algunos de los síntomas asociados con EM, como la espasticidad o el temblor. La administración de WIN55,212-2, THC, Met-AEA y JWH-133, pero no cannabidiol, mejoró la sintomatología de ratones con EAE, efecto que fue tan inmediato como a los 10 min post-administración (Baker y col., 2000). Los efectos de WIN55212-2 fueron revertidos con la administración de los antagonistas cannabinoides SR141716A (SR1) y SR144528 (SR2), mientras que la administración de estos compuestos por sí solos empeoró la sintomatología (Baker y col., 2000). El hecho de que el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> empeorara la sintomatología refuerza la hipótesis de que las propiedades terapéuticas de los cannabinoides estarían relacionadas con sus propiedades antiinflamatorias e inmunomoduladoras. Apoyando la hipótesis del papel inmunomodulador de los cannabinoides, se observó que la administración del agonista cannabinoide exógeno HU-211 poseía un efecto inhibitorio sobre la producción de TNF $\alpha$  en el cerebro y sangre periférica de ratones con EAE (Achiron y col., 2000). Trabajos de nuestro laboratorio han demostrado la administración diaria de los agonistas cannabinoides WIN55,212-2, ACEA y JWH-015 durante quince días a ratones infectados con el virus de Theiler mejoraban la función motora, disminuían el número de microglía activada en la médula espinal así como la expresión de moléculas MHC II y el número de células T CD4<sup>+</sup> infiltradas en la médula espinal, además

de promover la remielinización (Arévalo-Martín y col., 2003). En el mismo modelo experimental, la administración diaria de WIN55,212-2 durante cinco días, indujo una disminución de la severidad de la sintomatología clínica y una reducción de los niveles de ARNm de las citoquinas proinflamatorias TNF $\alpha$ , IL-1 $\beta$  e IL-6 en el SNC (Croxford y Miller, 2003).

El interés del papel jugado por el sistema endocannabinoide en los distintos modelos de EM se vio corroborado por cambios en la expresión de sus componentes. Así, Berrendero y col. (2001) encontraron que los animales sometidos a EAE aguda mostraban menor expresión del receptor CB $_1$  en corteza cerebral y el núcleo caudado-putamen, comparado con los animales control. Por su lado, Pryce y col. (2003) encontraron que ratones *silvestres* y *knock-out* para el receptor CB $_1$  no mostraban diferencias en el inicio ni en la valoración clínica de la sintomatología de EAE crónica, sin embargo en los últimos no se producía una remisión de los síntomas. Histológicamente, los ratones deficientes del receptor CB $_1$  mostraban unos niveles de neurofilamentos más bajos que en los silvestres mientras que los niveles de actividad de caspasa-3 eran muy superiores, indicando una mayor susceptibilidad al daño axonal en este modelo (Pryce y col., 2003). En este contexto, una cuestión importante es conocer si el sistema endocannabinoide, y en particular los ligandos más conocidos AEA y 2-AG, se modifican en situaciones de neuroinflamación y en particular en EM y en sus modelos experimentales. A este respecto, los primeros estudios de Baker y col. (2001) observaban un aumento de AEA y 2-AG en ratones que padecían de espasticidad en el modelo de EAE remitente-recurrente. Asimismo la administración de compuestos que inhibían la recaptura de AEA, como UCM707, OMDM $_1$  y OMDM $_2$ , producía una reducción en la severidad de la sintomatología neurológica en el modelo de EAE, lo que sugería la participación de este endocannabinoide en la mejora observada tras la administración de estos compuestos (de Lago y col., 2004; Ligresti y col., 2006).

Estas observaciones concuerdan con aquellas obtenidas en humanos, donde pacientes que sufren de EM y que consumen derivados de cannabinoides informan que sienten una mejoría en los síntomas relacionados con la alteración motora, como la espasticidad, el temblor y la ataxia (Clifford, 1983; Meinck y col., 1989; Maurer y col., 1990). En el año 2003 se publicaron los resultados de un estudio aleatorio y a gran escala con personas que padecían EM a las cuales se les administró oralmente una dosis de THC durante quince días. De acuerdo con este estudio denominado CAMS (del inglés *Cannabinoids in Multiple Sclerosis*), si bien no existe una mejora significativa de la gravedad de los síntomas de la enfermedad, el efecto del cannabinoide podría resultar terapéuticamente relevante en términos de alivio de la nocicepción y facilitación del inicio del movimiento, en particular en el andar (Zajicek y col., 2003). Además, en un estudio a más largo plazo con la misma población de pacientes, se demostraron cambios en la sintomatología motora. Sin embar-

go, una de las principales críticas de este estudio se refiere a la necesidad de realizar una evaluación riesgo/beneficio de este tratamiento, ya que el uso prolongado del THC podría repercutir negativamente sobre la función cognitiva del paciente (Iversen, 2005).

A pesar de todas estas observaciones, los mecanismos de acción por los cuales los cannabinoides afectan la sintomatología en los modelos animales o en la propia EM aún siguen sin conocerse a fondo dada la gran variedad de posibles dianas celulares susceptibles de ser reguladas por estos compuestos. Diversas líneas de investigación complementarias proponen que los cannabinoides pueden estar actuando: a) directamente sobre los núcleos motores y en el cerebelo (Herkenham y col., 1990; Herkenham y col., 1991); b) mediante un efecto neuroprotector, ya que los cannabinoides son capaces de limitar los procesos excitotóxicos y de degeneración neuronal (Pryce y col., 2003; Jackson y col., 2005; Docagne y col., 2007); c) por un papel remielinizante al promover *in vitro* la supervivencia de precursores de oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2003), además de la remielinización *in vivo* de fibras dañadas (Arévalo-Martín y col., 2003) y d) mediante la regulación de la respuesta inmune-inflamatoria. Cabe destacar que ninguna de estas posibilidades son mutuamente excluyentes y que probablemente todas contribuyan en distinta medida al efecto benéfico de los cannabinoides en situaciones de neuroinflamación.

Sin duda, el papel inmunomodulador de los cannabinoides juega un papel fundamental en el efecto beneficioso de estos compuestos en numerosas patologías que cursan con procesos neuroinflamatorios, ya sea modulando la inflamación autoinmune mediada por células T autorreactivas (Maresz y col., 2007) o bien regulando la producción de citoquinas por células de la glía (Parolaro y col., 2002, Ortega-Gutiérrez y col., 2005; Ullrich y col., 2007; Kawanokuchi y col., 2008). Especial papel juega la microglía durante el proceso inflamatorio del SNC mediante la producción de citoquinas, quimiocinas y especies reactivas de oxígeno y nitrógeno (Eikelenboom y col., 2006; Tichauer y col., 2007; Weinstein y col., 2007). Sin embargo, es poco aún lo que se sabe del potencial efecto terapéutico que pudiera tener el tratamiento con compuestos que modulen el tono cannabinoide endógeno o bien la misma administración de endocannabinoides sobre la reactividad microglial y los mecanismos moleculares que se mueven en respuesta al tratamiento con estos compuestos. Por ello se planteó como objetivo estudiar el efecto de la administración de compuestos que inhiben la recaptura de AEA, como el OMDM<sub>1</sub> y el OMDM<sub>2</sub> a ratones infectados con el virus de Theiler, centrando el estudio en la evaluación de la respuesta inmune-inflamatoria asociada.

## **2. Los inhibidores de la recaptura de AEA, OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> modulan el proceso inflamatorio en TMEV-IDD: papel de las células microfágico/microgliales.**

En el modelo de la encefalomielitis murina por infección con el virus de Theiler, el tratamiento con dos inhibidores selectivos de la recaptura de endocannabinoides, el OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> ejerció una protección efectiva contra los síntomas motores y tal vez mejora la progresión de la TMEV-IDD. Esta protección podría estar asociada, en parte, con un aumento en los niveles de AEA en médula espinal, el cual fue mayor con la administración de OMDM<sub>1</sub>. Estos resultados están en consonancia con las observaciones publicadas por Eljaschewitsch y col. (2006), en las cuales se evidenciaba unos niveles de AEA cuatro veces superior en pacientes con EM en fase activa, en comparación con individuos sanos y en lesiones inactivas. Asimismo en este trabajo no se observaban modificaciones en los niveles de 2-AG, lo que sugiere una cierta especificidad de los componentes del sistema endocannabinoide. Además, en apoyo a esta idea, Centonze y col. (2007) encontraron un aumento en los niveles de AEA en el líquido cefalorraquídeo de pacientes de EM en la fase de recurrencia y en linfocitos en sangre periférica. De manera que podría pensarse que AEA está especialmente modificada en EM, si bien hay que tener en cuenta que los métodos de determinación de endocannabinoides pueden no ser lo suficientemente sensibles, además de la complejidad de la enfermedad y sus diferentes fases en la evolución de la misma.

Además, existe una cierta controversia en cuanto a si el sistema endocannabinoide sufre modificaciones en situaciones inflamatorias con participación de linfocitos activados, ya que en un trabajo del grupo del Dr. Stella se mostraba que el IFN $\gamma$  producido por los linfocitos infiltrantes al parénquima nervioso interfería con la síntesis de endocannabinoides, en particular de 2-AG, aunque sin modificar la funcionalidad de los receptores cannabinoides (Witting y col., 2006). En nuestro laboratorio, utilizando el modelo de Theiler no encontrábamos un aumento significativo en los niveles de endocannabinoides en la médula de los ratones infectados, pero sí de AEA en los que habían recibido el tratamiento con los inhibidores de su recaptura. Además, la infección *in vitro* de macrófagos con el virus de Theiler también condujo a un incremento de AEA, lo que sugiere una reacción adaptativa orientada a modular negativamente la respuesta inflamatoria.

En este punto cabe destacar la capacidad del subtipo celular macrofágico/microglial de responder a, y por lo tanto ser diana de, los cannabinoides. Así, la microglía expresa ambos receptores cannabinoides, CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub> (Waksman y col., 1999; Benito y col., 2003), aunque en diferentes niveles de expresión y compartimentalización. Además posee toda la batería en enzimas de síntesis (Muccioli y col., 2007) así como de degradación de los endocannabinoides (Tham y col., 2007). De esta manera, varios estudios señalan la importancia de la producción de endocannabinoides en diversos procesos fisiológicos como la

migración celular de microglía, donde en este caso el 2-AG actuaría como quimioatrayente (Walter y col., 2003) o como inductor de la proliferación (Carrier y col., 2004); en ambos casos a través de un mecanismo mediado por el receptor CB<sub>2</sub>. Otros estudios destacan el papel de AEA en la regulación de citoquinas proinflamatorias (Eljaschewitsch y col., 2006; Fernández-Solari y col., 2006) y en neuroprotección (Kim y col., 2007). Los niveles de expresión de los receptores cannabinoides pueden sufrir cambios modulatorios en relación con la activación celular (Carlisle y col., 2002; Maresz y col., 2005). Se ha observado que la expresión de CB<sub>2</sub> en la médula espinal aumenta en modelos de dolor crónico asociados con el daño de nervios periféricos, en coincidencia con la aparición de microglía reactiva (Zhang y col., 2003). Además, la enfermedad de Alzheimer está asociada a placas que contienen microglía activada y que muestran un aumento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> (Benito y col., 2003; Ramírez y col., 2005). Situaciones de infección del SNC también inducen una modulación de la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, como en el caso de la infección con *Acanthamoeba culbertsoni*, agente causal de la encefalitis granulomatosa amebiana (Marciano-Cabral y Cabral, 2003) o la encefalomielitis por infección con el virus de la inmunodeficiencia humana (Benito et al., 2005). Sin embargo, y contrastando con estos estudios, recientemente se ha mostrado que en un modelo *in vitro* de activación secuencial, en el cual la microglía pasaba de un estado de reposo a uno de activación completa a través de distintas etapas, los niveles de expresión del receptor CB<sub>2</sub> mostraban primero una disminución para luego aumentar con respecto al estado basal (Cabral y Marciano-Cabral, 2005); mientras que los niveles de CB<sub>1</sub> permanecían constantes.

En concordancia con las observaciones previas en la que los cannabinoides son capaces de modular la respuesta microglial, tanto en situaciones fisiológicas como patológicas, en el presente estudio encontramos que el tratamiento con OMDM<sub>1</sub> redujo la activación de este tipo celular en la médula espinal de ratones infectados con TMEV. Por lo tanto, un aspecto importante de la protección frente al deterioro motor que encontramos en los animales infectados y tratados con los inhibidores de la recaptura de AEA, podría estar relacionado con la modulación de la respuesta inflamatoria en la médula espinal de estos ratones (Arévalo-Martín y col., 2003). Trabajos previos indicaban que los cannabinoides endógenos y exógenos eran capaces de modular las funciones del sistema inmune tanto en modelos experimentales *in vivo* como *in vitro* (Berdyshev y col., 2000; Klein y col., 2003). En particular, la activación de macrófagos/microglía esta reducida por acción de los cannabinoides, mostrando una menor capacidad de procesar antígenos (es decir, de funcionar como una APC) (McCoy y col., 1995), una menor secreción de IL-2 (McCoy y col., 1999), así como una menor producción de otras citoquinas proinflamatorias (Puffenbarger y col., 2000; Rivest, 2006; Ullrich y col., 2007), además de una reducción de las especies



reactivas de oxígeno y nitrógeno propias del “estallido respiratorio” celular (Iuvone y col., 2004; Esposito y col., 2006).

Junto a la menor reactividad microglial hallada en los cortes histológicos de médula espinal de ratones tratados con los inhibidores de la recaptura de AEA, OMDM<sub>1</sub> u OMDM<sub>2</sub>, y en consonancia con los antecedentes previamente descritos, encontramos que estos compuestos regulaban a la baja la expresión de moléculas MHC clase II, inducidas por el tratamiento *in vitro* con LPS/IFN $\gamma$  en cultivos primarios de macrófagos. Este efecto resulta particularmente importante si se tiene en cuenta el papel fundamental que juegan los macrófagos/microglía en la TMEV-IDD. La población macrofágica/microglial constituye un reservorio importante del virus y existen experimentos que muestran cómo la eliminación completa de macrófagos previene el inicio de la desmielinización crónica (Peña-Rossi y col., 1991). Este tipo celular expresa los receptores CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>, por lo cual es susceptible de responder al aumento del tono endocannabinoide que ocurre en situaciones de neuroinflamación (Walter y Stella, 2004). Así, el estímulo de macrófagos con LPS incrementa la producción de endocannabinoides, y de AEA en particular (Wagner y col., 1997; Di Marzo y col., 1999) lo que concuerda con la hipótesis de que los endocannabinoides cumplen un papel regulador de la función macrofágica/microglial. Interesantemente, los macrófagos infectados *in vitro* con TMEV produjeron selectivamente niveles elevados de AEA y no así de 2-AG. Cabe destacar además, que la exposición de macrófagos activados a AEA, OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> redujo la expresión de NOS-2. Esta enzima se ha visto implicada en procesos citotóxicos, particularmente en procesos de desmielinización. Tanto la producción endógena de NO por parte de macrófagos/microglía, como la generación de NO por parte de donantes exógenos producen muerte oligodendroglial (Mitrovic y col., 1995; Boullerne y col., 1999; Molina-Holgado y col., 2001). Diversos estudios han señalado un papel contradictorio de los cannabinoides en la regulación de NO. Así, Stefano y col. (1996) establecieron un efecto potenciador de los cannabinoides sobre la producción de este radical en monocitos, mientras que los resultados de Jeon y col. (1996) mostraban un descenso en la generación de NO en macrófagos activados, en células microgliales (Waksman y col., 1999) y astrocitos infectados con TMEV (Molina-Holgado y col., 1997). En concordancia con estos últimos, nuestros estudios muestran que el tratamiento con AEA redujo la expresión de NOS-2 en macrófagos activados, mientras que la co-administración con OMDM<sub>1</sub> potenció los efectos del endocannabinoide, corroborando el papel regulador de AEA sobre esta enzima. Este efecto fue parcialmente revertido por los antagonistas SR1 y SR2, lo que indica la participación de ambos receptores (CB<sub>1</sub> y CB<sub>2</sub>), en estos efectos.

Asimismo, el tratamiento con AEA, OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub> disminuyó la producción de IL-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  e IL-12p40 inducida por LPS/IFN $\gamma$ , y el co-tratamiento con OMDM<sub>1</sub> potenció los

efectos de AEA en la inhibición de IL-1 $\beta$ . En todas estas acciones es el receptor CB<sub>2</sub> el principal involucrado. Es interesante señalar que IL-1 $\beta$  está considerada como una de las principales citoquinas mediadoras del daño cerebral temprano inducido experimentalmente, siendo expresada inicialmente por macrófagos/microglía y posteriormente por astrocitos (Davies y col., 1999). Otros estudios muestran resultados similares con la utilización de cannabinoides exógenos, los cuales inhibían la expresión de varias citoquinas proinflamatorias, como IL-1 $\beta$ , en macrófagos y microglía (Klein y col., 2000; Puffenbarger y col., 2000), si bien queda por establecer el tipo de receptor cannabinoid involucrados.

Tomados en conjunto, estos resultados sugieren que el tratamiento con inhibidores de la recaptación de endocannabinoides mejora las funciones motoras y reduce la respuesta inflamatoria de células macrofágica/microgliales, lo que apoya el concepto de que una potenciación del tono endocannabinoide posee efectos beneficiosos sobre la severidad de la sintomatología neurológica e inflamatoria de la EM. Una de las posibles causas de esta mejora de los déficits motores de los ratones infectados con el virus de Theiler puede deberse a la acción directa del tono endocannabinoide aumentado sobre los circuitos neurales involucrados en el control motor o modulando vías nociceptivas. De esta manera el tratamiento con OMDM<sub>1</sub>, el cual a ciertas dosis puede actuar como agonista CB<sub>1</sub> (Ortar y col., 2003), fue altamente efectivo en mejorar las respuestas motoras en ambas pruebas conductuales. Asimismo fue el inhibidor de la recaptura de AEA que elevó con mayor eficacia los niveles endógenos de AEA en la médula espinal de ratones con TMEV-IDD. Sin embargo, esta mejora motora puede no ser atribuida exclusivamente a la acción directa de los endocannabinoides sobre los centros motores, sino a las acciones arriba señaladas que, además el efecto inmunomodulador podrían estar jugando un papel de relevancia en las mejoras conductuales al disminuir el proceso neuroinflamatorio, actuando principalmente sobre la microglía y modulando sus funciones (menor expresión de NOS-2 y de MHC II, niveles disminuidos del ARNm de TNF $\alpha$ , reducción en la producción de IL-1 $\beta$ ). Es decir, el tratamiento con inhibidores de la recaptura de AEA, al retardar la inactivación del endocannabinoide y por lo tanto, permitiendo que actúe durante más tiempo sobre varias dianas celulares como la microglía, resulta beneficioso ya que limitaría el daño asociado procesos inflamatorios crónicos.

### **3. La administración *in vivo* de AEA modula negativamente la expresión de IL-12 e IL-23.**

IL-12 e IL-23 forman parte de una familia de citoquinas heterodiméricas que juegan un papel importante en el establecimiento de la respuesta inmune de tipo adquirida. La

activación del receptor de IL-12 en células T vírgenes es fundamental para la completa activación de las mismas y su polarización de la respuesta inmune hacia un patrón de tipo Th1 (Gately y col., 1998; Trinchieri, 1998). Interesantemente, se ha descrito que pacientes con EM primaria progresiva poseen elevados niveles plasmáticos de IL-12 (Balashov y col., 1997) y que un aumento en la frecuencia de secreción de IL-12 por parte de monocitos parece estar correlacionado con la aparición de lesiones cerebrales activas detectadas por resonancia magnética nuclear (Makhlouf y col., 2001). Por su parte, IL-23 juega un papel relevante en la activación de la subpoblación de células T de memoria, rescatándolas de la anergia y manteniendo la síntesis de IL-17, una citoquina que recientemente ha sido implicada en el establecimiento y desarrollo de trastornos autoinmunes (Albanesi y col., 1999; Kurasawa y col., 2000; Homey col., 2000). Esta nueva subpoblación de linfocitos T da origen a un tipo de respuesta denominada Th<sub>IL-17</sub> (Aggarwal y col., 2003). Recientemente se está prestando mucha atención a este tipo de respuesta, ya que al parecer sería la responsable del desarrollo de respuestas de carácter autoinmunitario. Tomados en conjunto, estos antecedentes sugieren que la familia de citoquinas heterodiméricas juega un papel fundamental en el inicio y desarrollo de la respuesta inmune adquirida de tipo Th1, pero que en determinadas situaciones de desregulación de producción de las mismas, pueden contribuir al inicio de una respuesta de tipo autoinmune.

De esta manera, ambas citoquinas (IL-12 e IL-23) se han visto implicadas en procesos inflamatorios crónicos y modelos animales de patologías autoinmunes, como la artritis inducida por colágeno (McIntyre y col., 1996; Matthys y col., 1998; Murphy y col., 2003); la diabetes autoinmune (Trembleau y col., 2003); la enfermedad intestinal inflamatoria crónica (Schmidt y col., 2005); la fase efectora de la EAE, un modelo agudo de EM (Becher y col., 2002; Cua y col., 2003); entre otras enfermedades autoinmunes.

Hasta la fecha, los trabajos donde se han estudiado la relación entre el TMEV y la producción de citoquinas heterodiméricas han sido exclusivamente *in vitro* (Petro, 2005; Dahlberg y col., 2006) y los pocos estudios *in vivo* con el modelo de Theiler se limitaban a determinar alguna de estas citoquinas en fases específicas post-infección (Olson y col., 2001; Mack y col., 2003; Kang y col., 2005). En este estudio se presenta por primera vez el análisis del curso temporal de expresión de las subunidades constituyentes de IL-12 (p35/p40) e IL-23 (p19/p40) en la médula espinal de ratones infectados con el virus de Theiler. Este análisis mostró un patrón bifásico, con picos de expresión a los 35 y a los 90 días post-infección. A los 21 días posteriores a la inoculación intracraneal con el virus de Theiler, se detectan antígenos virales en la médula espinal y comienza la respuesta inmune contra el virus. Se produce entonces un aumento en la síntesis, principalmente, de IL-12 (incremento de las subunidades p35 y p40), el cual coincide con el pico de los niveles

del ARNm de p35 y p40 que ocurre a los 35 días post-infección. A medida que la presencia viral persiste, comienza a desarrollarse una respuesta autoinmune (Croxford y col., 2006) debido al fenómeno de expansión de epítomos y mimetismo molecular (McMahon y col., 2005; Croxford y col., 2005; Olson y col., 2005). En este sentido, se ha descrito que entre los 60 y 100 días post-infección (etapa que algunos autores definen como “crónico-temprana” de la TMEV-IDD), se generan anticuerpos autorreactivos contra la región antigénica 139-151 de la proteína proteolipídica (PLP<sub>139-151</sub>) (Croxford y col., 2006). Esta respuesta inicial contra proteínas propias se extiende a otras regiones antigénicas de la misma proteína (anticuerpos anti-PLP<sub>178-191</sub>, anti-PLP<sub>58-70</sub>), así como de otras nuevas proteínas (anticuerpos anti-MOG<sub>92-106</sub>, anti-MBP<sub>84-104</sub>), en lo que se ha dado en llamar la etapa “crónico-tardía” de la TMEV-IDD (Olson y col., 2002; McMahon y col., 2005; Croxford y col., 2006). En coincidencia con estas observaciones, a los 90 días se produce un incremento en los niveles del ARNm de las subunidades p35, p40 y especialmente de p19, lo que indica que durante esta etapa hay un aumento en la síntesis de IL-12 e IL-23. Dado que IL-23 juega un papel importante en el rescate de la anergia y la activación de las células T de memoria, así como el mantenimiento de la respuesta de tipo Th<sub>IL-17</sub> (Aggarwal y col., 2003), asociada a procesos autoinmunes (Becher y col., 2002; Cua y col., 2003), el aumento de la producción de IL-23 durante esta etapa podría estar relacionada con el fenómeno de expansión de epítomos y mimetismo molecular, es decir, con la aparición de anticuerpos reactivos frente a las proteínas de mielina PLP, MOG y MBP (McMahon y col., 2005).

El tratamiento de ratones infectados con el virus de Theiler a los 90 días con AEA, con Met-AEA o con AA-5HT redujo la expresión de las subunidades que conforman IL-12 e IL-23. Las tres estrategias de tratamiento arrojaron resultados similares, aunque en el caso del tratamiento con Met-AEA, no hubo una reducción considerable en los niveles del ARNm de p40. Cabe destacar que las tres estrategias, coincidían en la modulación del sistema endocannabinoide: ya sea por la administración directa de AEA, la administración de un análogo no hidrolizable (Met-AEA) o un inhibidor de la principal enzima de degradación de AEA, FAAH (AA-5HT). Estos resultados apoyan aquellos que obtuvimos cuando se sometían a los ratones con TMEV-IDD a un tratamiento con los inhibidores de la recaptura de AEA, OMDM<sub>1</sub> y OMDM<sub>2</sub>. Por tanto podemos afirmar que la modulación del sistema endocannabinoide mediante distintas estrategias resulta efectiva en la reducción de la producción de citoquinas proinflamatorias, regulando la respuesta inmune, lo que va acompañando de mejoras en la sintomatología de la patología TMEV-IDD.

#### 4. AEA modula la expresión *in vitro* de IL-12 e IL-23 mediante la activación de las vías de ERK1/2 y JNK MAPKs, así como la inactivación de la vía de PI3K/Akt.

Siendo la microglía la principal productora de estas citoquinas en el SNC y teniendo los cannabinoides la capacidad de modular la activación de este tipo celular (Felder y col., 1992; Cabral y col., 1995), se procedió a estudiar los mecanismos moleculares a través de los cuales AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23, tanto a nivel de las subunidades que las conforman así como de las citoquinas biológicamente activas. Estudios previos señalaban la participación de los receptores cannabinoides, en particular del receptor CB<sub>2</sub> en la regulación de la producción de citoquinas proinflamatorias (Puffenbarger y col., 2000; Rajesh y col., 2007), aunque no existían datos sobre la regulación de IL-12/IL-23. Nuestras primeras observaciones utilizando cultivos primarios de macrófagos y tratándolo con AEA u OMDM<sub>1</sub> mostraron una reducción en la liberación de IL-12p40 por parte de estas células *in vitro* con el virus de Theiler, lo cual es consistente con el papel inmunomodulador de los endocannabinoides. IL-12 es una citoquina muy importante en el paso de la inmunidad innata a la inmunidad adquirida. Juega un papel fundamental en la activación completa de linfocitos T CD4<sup>+</sup> vírgenes y los dirige hacia un patrón de respuesta de tipo Th1. Por lo tanto, el aumento en la síntesis de IL-12p40 es respuesta a la infección *in vitro* de macrófagos con el virus de Theiler contribuye a la activación y diferenciación de células Th1, la cual constituye la mayor respuesta inmune del SNC al TMEV (Pope y col., 1996). Esta disminución de la producción de IL-12p40 luego del tratamiento con AEA y OMDM<sub>1</sub> puede tener importantes implicaciones en la respuesta inflamatoria inicial, así como en la subsiguiente respuesta inmune adaptativa a los antígenos virales y la subsecuente desmielinización. Cabe destacar que los efectos inducidos por AEA se vieron potenciados por el co-tratamiento con OMDM<sub>1</sub>. En consonancia con dichas observaciones previas, en nuestro estudio, el uso del antagonista del receptor CB<sub>2</sub>, SR2, revirtió los efectos de AEA sobre la síntesis de IL-12 e IL-23. Estas observaciones se vieron confirmadas con el uso del agonista específico CB<sub>2</sub>, el JWH-133, obteniéndose resultados similares que con AEA. Interesantemente, cultivos de microglía humana parecen comportarse de igual manera ya que encontramos que la síntesis de IL-12 e IL-23 fue inhibida tras el tratamiento con AEA y revertidas por el antagonismo con SR2. Estas células expresan receptores CB<sub>2</sub> (Núñez y col., 2004; Benito y col., 2007), el cual también participa en la regulación de la expresión de IL-12 e IL-23 humanas.

El receptor CB<sub>2</sub> señala, entre otras vías, a través de la vía de las quinasas activadas por mitógenos (MAPK) de manera dependiente de la activación de proteínas G<sub>i/o</sub> (Bouaboula y col., 1995; Wartmann y col., 1995; Bouaboula y col., 1996). En nuestro estu-

dio, cuando se coestimularon cultivos primarios de microglía con LPS/IFN $\gamma$  más AEA, se observó una potenciación de la fosforilación de ERK1/2, aunque se mantenía el mismo perfil temporal de activación. El uso del inhibidor de la vía de ERK1/2 MAPK, el PD98059, demostró que esta vía participa negativamente en la expresión de p35 y p40, modificando los niveles de IL-12. Por su parte, al estar inhibida dicha vía, los niveles de p19 disminuyeron, por lo que finalmente, los niveles de IL-23 no se veían modificados. Estos hallazgos concuerdan con los reportados por Martin y col. (2003) y por Kim y col. (2005) sobre la participación de ERK1/2 en la regulación negativa de estas citoquinas. Además, el antagonismo del receptor CB $_2$  bloqueó los efectos de AEA sobre la fosforilación de ERK1/2 y la participación de este receptor se vio confirmada por el uso del agonista específico de CB $_2$ , el JWH-133, con el cual se obtuvieron resultados similares (Yanagawa y col., 2002).

Otra de las vías modificadas por AEA fue la vía de JNK MAPK. En este caso, el cotratamiento con AEA indujo la fosforilación de JNK a tiempos cortos (a los quince minutos post-estímulo) y la mantuvo activada por más tiempo, aunque con la misma intensidad que el caso de LPS/IFN $\gamma$  solo. Cuando se inhibió JNK, mediante el inhibidor específico SP600125, produjo un aumento en la expresión de los ARNm de p35 y p19, mientras que no se modificaron los niveles de p40. Esto se tradujo en un aumento de la producción de las citoquinas biológicamente activas, determinadas por ELISA en los sobrenadantes de cultivos. Por lo tanto, la vía de JNK participa negativamente en la regulación de ambas citoquinas, IL-12 e IL-23 (Hidding y col., 2002; Utsugi y col., 2005). Además, al antagonizarse el receptor CB $_2$  con SR2, los efectos de AEA sobre la fosforilación de JNK se revirtieron, lo cual confirma la participación de este receptor en los efectos de AEA.

Por otro lado, aún cuando la vía de p38 MAPK está implicada en la regulación de IL-12 e IL-23, en este caso, favoreciendo su producción, AEA no actúa interfiriendo en esta ruta de señalización, ya que su activación no se vio modificada por el cotratamiento del endocannabinoide más estímulo de LPS/IFN $\gamma$ .

Otras de las vías utilizadas por los cannabinoides es la ruta de PI3K/Akt, fundamentalmente mediando la supervivencia, por ejemplo, en relación con sus acciones anti-apoptóticas en cultivos primarios de precursores de oligodendrocitos (Molina-Holgado y col., 2002), el co-tratamiento de AEA con LPS/IFN $\gamma$  redujo significativamente la activación de esta vía. La inhibición farmacológica de Akt con dos inhibidores, Ly294002 y wortmanina, disminuyó significativamente la producción de IL-12 e IL-23, por lo que esta vía está positivamente involucrada en la expresión de estas citoquinas (la Sala y col., 2005; Yang y col., 2006). El hecho de que el co-tratamiento con AEA inhibiera la activación de Akt confirma la participación de esta vía en la regulación de IL-12 e IL-23.

De manera que se puede afirmar que diferentes vías de señalización están contribu-

yendo a los efectos inhibidores de AEA sobre el eje IL-12/IL-23. Si bien nuestros resultados en microglía confirman previas observaciones sobre la regulación de estas citoquinas heterodiméricas en estudios realizados fundamentalmente en macrófagos, no hay datos anteriores a este estudio acerca de los mecanismos de acción de AEA en la supresión de las citoquinas IL-12 e IL-23 en células microgliales.

Interesantemente, la inhibición de la enzima FAAH con el compuesto AA-5HT produjo una disminución dosis-dependiente de los niveles de IL-12 e IL-23, lo que apoya fuertemente la hipótesis de que, a su vez, el aumento del tono endocannabinoide podría considerarse como una potencial diana terapéutica debido a sus propiedades antiinflamatorias. Otros estudios mostraron que la inhibición de la enzima FAAH disminuía la expresión de moléculas proinflamatorias, como COX-2, prostaglandina E<sub>2</sub> y NO en microglía de rata (Tham y col., 2007).

Si se revisa de manera general los efectos de los cannabinoides sobre las respuestas inmune-inflamatorias, se aprecia que hay un cierto número de estudios que describen la capacidad de estos compuestos de favorecer los procesos antiinflamatorios.

La microglía participa en numerosos procesos inflamatorios proliferando (Hailer y col., 1999), retrayendo sus procesos y adquiriendo una forma ameboide (Stence y col., 2001), liberando citoquinas proinflamatorias (Becher y col., 2000) y fagocitando restos celulares (Becher y col., 2000). Por otra parte, este tipo celular es uno de los responsable del aumento de los niveles de endocannabinoides que ocurren en numerosas condiciones neuropatológicas (Mechoulam y col., 2002), como en EM (Eljaschewitsch y col., 2006), isquemia focal cerebral (Franklin y col., 2003), lesiones traumáticas del SNC (Panikashvili y col., 2001) y otras patologías. En estos procesos neuroinflamatorios es necesario que exista un delicado balance entre la producción de citoquinas pro- y antiinflamatorias (Aste-Amezaga y col., 1998; Shnyra y col., 1998; Harizi y col., 2004), de manera que se mantenga la inflamación dentro de los límites adecuados. Por otra parte, se sabe de la capacidad de los cannabinoides de producir un cambio de la respuesta inmune de tipo Th1 hacia un fenotipo Th2 mediante la modificación de citoquinas producidas por la microglía, los macrófagos y las células dendrítica, y que regulan la polarización de este tipo de células linfocitarias (Klein y col. 2000; Klein y col., 2003). Uno de las citoquinas más importantes en el establecimiento del fenotipo Th2 es IL-10 (Moore y col., 1993; Sieling y col., 1993). El tratamiento con AEA indujo un aumento en la producción de IL-10, mediado por la activación del receptor CB<sub>2</sub>, ya que un bloqueo del mismo con el antagonista SR2 revirtió dicho efecto. Asimismo, el uso del agonista específico CB<sub>2</sub>, el JWH-133, produjo resultados similares que el tratamiento con AEA. La señalización de ERK1/2 está involucrada positivamente en los efectos de AEA sobre IL-10, ya que su inhibición con el inhibidor de

MEK, el PD98059, disminuyó marcadamente la producción de esta citoquina antiinflamatoria.

Varios estudios demuestran la capacidad de IL-10 de regular la expresión endógena de IL-12 en distintas patologías (Fiorentino y col., 1991; D'Andrea y col., 1993; Keller y col., 2006) así como en modelos animales (Enk y col., 1993; De Smedt y col., 1997; Peng y col., 2006). El bloqueo de la producción endógena de IL-10 mediante el uso de un anticuerpo específico (anti-IL-10 naciente) no sólo indujo un aumento en la síntesis de IL-12, y en menor medida de IL-23, sino que además revirtió los efectos de AEA, indicando que la producción de esta citoquina juega un papel importante en los efectos del endocannabinoide sobre las citoquinas proinflamatorias.

Por lo tanto, AEA no sólo regula directamente la producción de IL-12 e IL-23, sino que lo hace también indirectamente a través de la síntesis de IL-10. Esta regulación directa, mediante la activación del receptor CB<sub>2</sub> y la consiguiente activación de las vías de ERK1/2 y JNK MAPKs, así como la inhibición de Akt, se podrían considerar como mecanismos “a corto plazo”, ya que estos ocurren inmediatamente después del tratamiento con AEA. La producción de IL-10 y el efecto de esta citoquina antiinflamatoria sobre la producción de IL-12 e IL-23 sería, a su vez, un mecanismo “a largo plazo”, ya que requiere de la síntesis protéica, secreción de la citoquina, unión a la misma a su receptor para ejercer sus efectos moduladores y podría contribuir a estabilizar la inhibición de IL-12 e IL-23.

## **5. AEA regula la expresión de IL-12p40 mediante mecanismos independientes de receptores cannabinoides.**

La inflamación, producida como consecuencia de un daño al SNC, es una respuesta autodefensiva que está orientada a eliminar o neutralizar los estímulos lesivos, restaurando la integridad del tejido. Sin embargo, superado cierto umbral, que depende de la naturaleza de cada tejido en particular, esta respuesta puede volverse excesiva, dañando al mismo tejido que pretende proteger. Dentro de la respuesta inflamatoria no sólo participan componentes de la respuesta innata del sistema inmune, sino también de la inmunidad adaptativa (Schwartz y col., 2006). Esta interrelación entre el sistema nervioso y el sistema inmune es bastante compleja e incluso puede parecer contradictoria, ya que, dependiendo del contexto, una misma respuesta puede ser beneficiosa o dañina. Históricamente se ha considerado que el proceso inflamatorio dentro del SNC era más bien perjudicial para la integridad del tejido, en parte dado al bajo umbral de tolerancia que posee el mismo a las desviaciones de su estado homeostático. Sin embargo, de acuerdo a algu-



nos trabajos, la intervención inmune por parte de macrófagos y microglía, promueve la regeneración axonal (Rapalino y col., 1998; Fitch y col., 1999), mientras que la intervención por parte de células T dispara procesos de mantenimiento y reparación, promoviendo la recuperación funcional en situaciones de trauma del SNC (Hauben y col., 2000). Según un estudio de Byram y col. (2004), puede existir neuroprotección mediada por células T CD4<sup>+</sup>, la cual dependería tanto de la microglía como de APCs periféricas. Algunos autores han llegado a sugerir incluso que la respuesta autoinmunitaria puede ser neuroprotectora en algunas enfermedades neurodegenerativas (Schwartz y Kipnis, 2005; Hendrix y Nitsch, 2007). En cualquier caso, la microglía es un tipo celular esencial tanto en la homeostasis del SNC como en los procesos patológicos. Así, células responden diferencialmente al mismo estímulo dependiendo de si otro estímulo lo precede o antecede. Es decir, que la conducta microglial está dictada por un fenotipo adquirido más que por una respuesta estereotipada. La influencia que tiene la primera señal sobre la segunda, y que modifican el resultado final, pueden clasificarse como: 1) *priming* (el preconditionamiento en la cual un primer estímulo prepara a la célula para una respuesta frente a un segundo estímulo); 2) *priming negativo* (llamado también desensibilización) e 3) *interferencia* (el segundo estímulo ejerce un efecto inhibitorio sobre la respuesta ya en marcha desencadenada por un primer estímulo). Esta interacción entre ambas señales se vuelve más compleja cuando el intervalo entre ambos estímulos (conocido como “memoria”) varía (Häusler y col., 2002; Butovsky y col., 2005). Esto sugiere que con la llegada de un estímulo modulador (el segundo), la respuesta ejecutora microglial puede modificarse no sólo en magnitud sino también en calidad. De esta manera, la actividad microglial no es sólo un reflejo de la fuerza o de la persistencia de un estímulo sino que está determinada principalmente por la naturaleza y el contexto de las distintas señales (Shaked y col., 2005).

Este cambio fenotípico de la microglía en respuesta a estímulos también se ve reflejado en la expresión de los receptores cannabinoides. Así, Cabral y Marciano-Cabral (2005) muestran que en un modelo de activación secuencial de la microglía, la expresión del receptor CB<sub>1</sub> era constitutiva, mientras que la de CB<sub>2</sub> era inducible y variaba de acuerdo al grado de activación celular, encontrándose los niveles más bajos cuando la célula estaba completamente activada. Otros modelos de activación microglial o de situaciones de lesión del SNC mostraron un aumento en la expresión del receptor CB<sub>2</sub> (Carlisle y col., 2002; Benito y col., 2003; Zhang y col., 2003; Maresz y col., 2005). Contrastando con estos estudios y de acuerdo con los de Cabral y Marciano-Cabral, en el presente estudio, la determinación de los niveles del ARNm de CB<sub>2</sub> tanto a las 8hs como a las 18hs post-estímulo mostró valores menores a los basales. En estas condiciones, el antagonismo del receptor CB<sub>2</sub> fue incapaz de revertir los efectos de AEA sobre la producción de IL-12p40.

Estos resultados se consideran de gran interés puesto que AEA podría estar actuando a través de otros mecanismos independientes de la activación de receptores cannabinoides.

Así, cuando estudiamos si AEA modificaba la actividad transcripcional del promotor de la subunidad p40, la cual forma parte de IL-12 e IL-23, observamos que el tratamiento con AEA disminuía la expresión de p40, pero que no estaban implicados ni receptores cannabinoides CB<sub>1</sub> (SR1) ni CB<sub>2</sub> (SR2), ni el receptor vanilloide (TRPV<sub>1</sub>), ya que en ningún caso los respectivos antagonistas consiguieron revertir dicho efecto.

El promotor de p40 cuenta con los sitios de activación (*enhancer*) ETS, NFκB y C/EBPB (Plevy y col., 1997; Becker y col., 2001) que en condiciones de inflamación promueven la síntesis de dicha subunidad. Asimismo cuenta con un represor constitutivo, denominado GA-12, e inhibe la expresión de p40 en situaciones basales (Becker y col., 2001). A fin de estudiar la regulación de AEA sobre la expresión de p40 se realizaron experimentos con construcciones que portaban mutaciones puntuales en tanto en los sitios de activación como en el sitio represor. De todas estas construcciones mutantes, la única que fue capaz de revertir los efectos de AEA fue la que llevaba la mutación en el represor GA-12. Esto sugiere que el mecanismo de acción de AEA sobre el promotor de p40 implica la activación del represor. A fin de confirmar estos hallazgos se realizó un ensayo de oligonucleótidos señuelo (*decoy oligonucleotide assay*). El resultado de estos experimentos confirmó la hipótesis de la participación del represor GA-12 en los efectos de AEA sobre la activación del promotor de p40.

Varios estudios señalan la capacidad de COX-2 de oxigenar a endocannabinoides para generar una serie de compuestos estructuralmente relacionados a las prostaglandinas (Matias y col., 2004; Glass y col., 2005). En particular, AEA puede ser sustrato de COX-2 para generar prostaglandina-etanolamidas, siendo la más importante en términos de cantidad, la prostamida E<sub>2</sub> (Ross y col., 2002; Fowler, 2007). Por lo tanto se procedió a analizar el efecto de prostamida E<sub>2</sub> sobre el promotor de p40, el cual disminuyó la actividad transcripcional del mismo de una manera dosis-dependiente. Dado que las prostamidas están estructuralmente relacionadas a las prostaglandinas (Glass y col., 2005), se procedió a estudiar la participación de los receptores prostanoideos, encontrándose que el antagonismo con AH3809 (antagonista EP<sub>2</sub>) fue capaz de revertir tanto los efectos de prostamida E<sub>2</sub> como de AEA, mientras que el antagonismo con AH23848B (antagonista EP<sub>4</sub>) careció de efectos. El hecho de que el antagonista de EP<sub>2</sub> revirtiera los efectos de AEA y de prostamida E<sub>2</sub> sugiere que ambos compuestos comparten mecanismos de acción similares. Sin embargo no pueden descartarse otros mecanismos de acción, así como la existencia de otros receptores cannabinoides (Di Marzo y col., 2002) o la participación de las “balsas de lípidos” (*lipid rafts*). El aumento en la expresión de COX-2 en microglía activa-

da puede favorecer la oxigenación de AEA y por lo tanto la generación de prostamida E<sub>2</sub>, la cual a su vez puede contribuir a la disminución de la síntesis de IL-12p40. Si COX-2 juega un papel importante en el metabolismo de AEA, entonces la inhibición de la misma debería influir positivamente en la producción de IL-12p40. De hecho, cuando se inhibió COX-2 con el inhibidor específico NS-398, el efecto de AEA fue revertido mientras que se mantuvo el de prostamida E<sub>2</sub>. Así, durante la inflamación, la sobreexpresión de COX-2 puede llevar el metabolismo de AEA hacia la producción de prostamida E<sub>2</sub>, la cual puede contribuir a su vez a la disminución de la producción de IL-12p40. Apoyando estas observaciones, el grupo de Kaminski (Rockwell y Kaminski, 2004) mostró que AEA producía una disminución dependiente de la dosis de IL-2 en esplenocitos murinos mediante un mecanismo dependiente de COX-2 e independiente de receptores cannabinoides CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub>. De esta manera, una producción elevada de COX-2 como resultado del proceso inflamatorio, tendrá un impacto significativo sobre el sistema endocannabinoide y sobre el resultado final en cuanto a la producción de citoquinas proinflamatorias.

En resumen, los mecanismos de acción que utiliza AEA para ejercer sus efectos reguladores sobre la producción de citoquinas heterodiméricas dependerían del “estado de activación celular”. Es decir, se podría hipotetizar que en un primer momento, cuando llega inicialmente el estímulo proinflamatorio se desencadena tanto la señalización del mismo como la síntesis de AEA. Este endocannabinoide es liberado al medio extracelular donde se uniría al receptor CB<sub>2</sub>, señalizando a través de él mediante la fosforilación de las vías de las quinasas ERK1/2 y JNK y la desfosforilación de la vía de Akt, modulando así la señal de estímulo proinflamatorio. En etapas posteriores, cuando la célula ha respondido a dicho estímulo con la síntesis de nuevos mediadores inflamatorios, en particular de COX-2, y se produce la disminución de la expresión del receptor CB<sub>2</sub>, la AEA podría ser internalizada por el sistema de recaptura y, una vez dentro del citoplasma celular, oxigenada por COX-2 para generar prostamidas, en particular prostamida E<sub>2</sub>, la cual a su vez se uniría al receptor prostanoide nuclear EP2, señalizando a través de él y modulando la síntesis de las citoquinas heterodiméricas. Esta hipótesis resalta la plasticidad del sistema endocannabinoide en cuanto a que es capaz de actuar mediante distintos mecanismos de acción dependiendo del estado de activación celular, los cuales convergen hacia la modulación de la respuesta inflamatoria.

En resumen, tanto los resultados *in vivo* en el modelo de TMEV-IDD como *in vitro* en los cultivos de células macrofágico/microgliales, indican que la manipulación del sistema endocannabinoide es una potencial diana terapéutica para el tratamiento de patologías que cursan con inflamación del SNC, como lo es la EM.



## Conclusiones



1. La manipulación farmacológica del sistema endocannabinoide mediante la administración de compuestos que inhiben la recaptura de anandamida mejora la sintomatología motora asociada a la TMEV-IDD. El aumento del tono endocannabinoide disminuye la reactividad microglial en la médula espinal de ratones con TMEV-IDD y la expresión de las moléculas de MHC II, NO, IL-1 $\beta$  e IL-12p40 en macrófagos infectados *in vitro* con TMEV.
2. El análisis del curso temporal de expresión del ARNm de las subunidades p35, p40 y p19 que conforman las citoquinas IL-12 (p35/p40) e IL-23 (p19/p40) en la médula espinal de ratones con TMEV-IDD revela un patrón bifásico, con picos a los 35 y 90 días post-infección.
3. La administración subcrónica de AEA mediante el uso de bombas osmóticas, del análogo metabólicamente estable Met-AEA y el tratamiento con el inhibidor de FAAH, AA-5HT, inhiben la expresión del ARNm de p35, p40 y p19.
4. AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23, así como de sus subunidades constituyentes, a través de la activación del receptor CB<sub>2</sub>, tanto en cultivos primarios de microglía murina como de humanos. Este efecto se ve confirmado con el uso del agonista específico CB<sub>2</sub>, el JWH-133 y la reversión del efecto con el antagonismo de dicho receptor usando el antagonista específico de CB<sub>2</sub>, el SR2.
5. AEA regula la expresión de IL-12 e IL-23 mediante la potenciación de la fosforilación de ERK1/2 MAPK, una activación más prolongada en el tiempo de JNK MAPK y la inhibición de la activación de la vía de Akt. Todos estos mecanismos son dependientes de la activación del receptor CB<sub>2</sub>.
6. La inhibición *in vitro* de la enzima FAAH, en cultivos primarios de microglía, reduce la expresión de IL-12 e IL-23 en forma dependiente de la dosis.
7. AEA potencia la producción de IL-10 inducida tanto por el tratamiento con LPS/IFN $\gamma$  como por la infección *in vitro* con el virus de Theiler. Este efecto está mediado por el receptor CB<sub>2</sub>, efecto que se confirma con el uso del agonista específico JWH-133 y del antagonista específico SR2, el cual revierte los efectos de AEA y de JWH-133.
8. El estímulo con LPS/IFN $\gamma$  reduce la expresión del ARNm del receptor CB<sub>2</sub> e induce la expresión de la enzima COX-2, efecto que se manifiesta ya a las 8 horas post-estímulo. El

tratamiento con AEA de cultivos primarios de microglía pre-tratados durante 8 horas con LPS/IFN $\gamma$ , y que por lo tanto poseen un menor expresión del receptor CB $_2$ , es capaz de reducir la expresión de IL-12p40 mediante un efecto que no es revertido por el uso del antagonista CB $_2$ , SR2.

11. AEA regula la activación del promotor de IL-12p40 mediante un mecanismo independiente de receptores cannabinoides y que involucra la activación del elemento represor GA-12.

12. El metabolito de AEA vía COX-2, prostamida E $_2$  regula la activación del promotor de IL-12p40 de manera dependiente de la dosis, actuando sobre el represor GA-12. Reduce, además, la expresión del ARNm de las subunidades constituyentes de IL-12 e IL-23 en cultivos primarios de microglía.

13. El efecto de AEA y prostamida E $_2$  sobre la actividad del promotor de IL-12p40, así como su síntesis protéica dependen de la activación del receptor prostanoide EP2, ya que el antagonismo del mismo con AH6809 revierte los efectos de ambos compuestos.

14. La inhibición de la enzima COX-2 con el inhibidor específico NS398 revierte los efectos de AEA sobre la activación del promotor de IL-12p40, así como de su síntesis protéica.



## Bibliografía



- Achiron A, Miron S, Lavie V, Margalit R, Biegon A (2000) Dexanabinol (HU-211) effect on experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for the treatment of acute relapses of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 102:26-31.
- Aggarwal S, Ghilardi N, Xie MH, de Sauvage FJ, Gurney AL (2003) Interleukin-23 promotes a distinct CD4 T cell activation state characterized by the production of interleukin-17. *J Biol Chem* 278:1910-1914.
- Akasaki Y, Kikuchi T, Homma S, Abe T, Kofe D, Ohno T (2001) Antitumor Effect of Immunizations With Fusions of Dendritic and Glioma Cells in a Mouse Brain Tumor Model. *J Immunother* 24:106-113.
- Aktas O, Ari N, Rioks M, Hoffmann V, Schimrigk S, Przuntek H, Pohlau D (2001) Multiple sclerosis: modulation of apoptosis susceptibility by glatiramer acetate. *Acta Neurol Scand* 104:266-270.
- Albanesi C, Cavani A, Girolomoni G (1999) IL-17 is produced by nickel-specific T lymphocytes and regulates ICAM-1 expression and chemokine production in human keratinocytes: synergistic or antagonist effects with IFN-gamma and TNF-alpha. *J Immunol* 162:494-502.
- Aloisi F, Care A, Borsellino G, Gallo P, Rosa S, Bassani A, Cabibbo A, Testa U, Levi G, Peschle C (1992) Production of hemolymphopoietic cytokines (IL-6, IL-8, colony-stimulating factors) by normal human astrocytes in response to IL-1 beta and tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol* 149:2358-2366.
- Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L (1998) Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol* 160:4671-4680.
- Aloisi F, Ria F, Adorini L (2000) Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol Today* 21:141-147.
- Alter M (1976) Is multiple sclerosis an age-dependent host response to measles? *Lancet* 1:456-457.
- Alter M, Cendrowski W (1976) Multiple sclerosis and childhood infections. *Neurology* 26:201-204.
- Arnett HA, Mason J, Marino M, Suzuki K, Matsushima GK, Ting JP (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4:1116-1122.
- Ashton JC, Rahman RM, Nair SM, Sutherland BA, Glass M, Appleton I (2007) Cerebral hypoxia-ischemia and middle cerebral artery occlusion induce expression of the cannabinoid CB2 receptor in the brain. *Neurosci Lett* 412:114-117.
- Aste-Amezaga M, Ma X, Sartori A, Trinchieri G (1998) Molecular mechanisms of the induction of IL-12 and its inhibition by IL-10. *J Immunol* 160:5936-5944.
- Arévalo-Martín A, Vela JM, Molina-Holgado E, Borrell J, Guaza C (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 23:2511-2516.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Huffman JW, Layward L (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* 404:84-87.
- Baker D, Pryce G, Croxford JL, Brown P, Pertwee RG, Makriyannis A, Khanolkar A, Layward L, Fezza F, Bisogno T, Di M, V (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J* 15:300-302.
- Baker D, Pryce G, Giovannoni G, Thompson AJ (2003) The therapeutic potential of cannabis. *Lancet Neurol* 2:291-298.
- Balashov KE, Smith DR, Khoury SJ, Hafler DA, Weiner HL (1997) Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94:599-603.
- Banati RB, Gehrmann J, Schubert P, Kreutzberg GW (1993) Cytotoxicity of microglia. *Glia* 7:111-118.
- Barnum SR, Ames RS, Maycox PR, Hadingham SJ, Meakin J, Harrison D, Parsons AA (2002) Expression of the complement C3a and C5a receptors after permanent focal ischemia: An alternative interpretation. *Glia* 38:169-173.

- Basavarajappa BS, Saito M, Cooper TB, Hungund BL (2003) Chronic ethanol inhibits the anandamide transport and increases extracellular anandamide levels in cerebellar granule neurons. *Eur J Pharmacol* 466:73-83.
- Becher B, Blain M, Antel JP (2000) CD40 engagement stimulates IL-12 p70 production by human microglial cells: basis for Th1 polarization in the CNS. *J Neuroimmunol* 102:44-50.
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ (2002) Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J Clin Invest* 110:493-497.
- Bechmann I, Peter S, Beyer M, Gimsa U, Nitsch R (2001) Presence of B7-2 (CD86) and lack of B7-1 (CD80) on myelin phagocytosing MHC-II-positive rat microglia is associated with nondestructive immunity in vivo. *FASEB J* 15:1086-1088.
- Beck RW, Cleary PA, Trobe JD, Kaufman DI, Kupersmith MJ, Paty DW, Brown CH (1993) The effect of corticosteroids for acute optic neuritis on the subsequent development of multiple sclerosis. The Optic Neuritis Study Group. *N Engl J Med* 329:1764-1769.
- Becker C, Wirtz S, Ma X, Blessing M, Galle PR, Neurath MF (2001) Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF-kappaB, CCAAT/enhancer-binding protein beta, and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin E(2). *J Immunol* 167:2608-2618.
- Begolka WS, Vanderlugt CL, Rahbe SM, Miller SD (1998) Differential expression of inflammatory cytokines parallels progression of central nervous system pathology in two clinically distinct models of multiple sclerosis. *J Immunol* 161:4437-4446.
- Belladonna ML, Renauld JC, Bianchi R, Vacca C, Fallarino F, Orabona C, Fioretti MC, Grohmann U, Puccetti P (2002) IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J Immunol* 168:5448-5454.
- Beltramo M, Stella N, Calignano A, Lin SY, Makriyannis A, Piomelli D (1997) Functional role of high-affinity anandamide transport, as revealed by selective inhibition. *Science* 277:1094-1097.
- Ben-Shabat S, Fride E, Sheskin T, Tamiri T, Rhee MH, Vogel Z, Bisogno T, De Petrocellis L, Di Marzo V, Mechoulam R (1998) An entourage effect: inactive endogenous fatty acid glycerol esters enhance 2-arachidonoyl-glycerol cannabinoid activity. *Eur J Pharmacol* 353:23-31.
- Benito C, Kim WK, Chavarria I, Hillard CJ, Mackie K, Tolon RM, Williams K, Romero J (2005) A glial endogenous cannabinoid system is upregulated in the brains of macaques with simian immunodeficiency virus-induced encephalitis. *J Neurosci* 25:2530-2536.
- Benito C, Romero JP, Tolon RM, Clemente D, Docagne F, Hillard CJ, Guaza C, Romero J (2007) Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J Neurosci* 27:2396-2402.
- Benveniste EN (1997) Role of macrophages/microglia in multiple sclerosis and experimental allergic encephalomyelitis. *J Mol Med* 75:165-173.
- Berdyshev EV (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem Phys Lipids* 108:169-190.
- Berrendero F, Sepe N, Ramos JA, Di Marzo V, Fernandez-Ruiz JJ (1999) Analysis of cannabinoid receptor binding and mRNA expression and endogenous cannabinoid contents in the developing rat brain during late gestation and early postnatal period. *Synapse* 33:181-191.
- Berrendero F, Sánchez A, Cabranes A, Puerta C, Ramos JA, García-Merino A, Fernández-Ruiz J (2001) Changes in cannabinoid CB(1) receptors in striatal and cortical regions of rats with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* 41:195-202.
- Bettelli E, Carrier Y, Gao W, Korn T, Strom TB, Oukka M, Weiner HL, Kuchroo VK (2006) Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.

- Betts CD, D'Mellow MT, Fowler CJ (1993) Urinary symptoms and the neurological features of bladder dysfunction in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:245-250.
- Bisogno T, Maurelli S, Melck D, De Petrocellis L, Di Marzo V (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J Biol Chem* 272:3315-3323.
- Bisogno T, Berrendero F, Ambrosino G, Cebeira M, Ramos JA, Fernandez-Ruiz JJ, Di Marzo V (1999) Brain regional distribution of endocannabinoids: implications for their biosynthesis and biological function. *Biochem Biophys Res Commun* 256:377-380.
- Bisogno T, Melck D, Bobrov MY, Gretskaya NM, Bezuglov VV, De Petrocellis L, Di Marzo V (2000) N-acyl-dopamines: novel synthetic CB(1) cannabinoid-receptor ligands and inhibitors of anandamide inactivation with cannabimimetic activity in vitro and in vivo. *Biochem J* 351 Pt 3:817-824.
- Bisogno T, Howell F, Williams G, Minassi A, Cascio MG, Ligresti A, Matias I, Schiano-Moriello A, Paul P, Williams EJ, Gangadharan U, Hobbs C, Di Marzo V, Doherty P (2003) Cloning of the first sn1-DAG lipases points to the spatial and temporal regulation of endocannabinoid signaling in the brain. *J Cell Biol* 163:463-468.
- Biswas KK, Sarker KP, Abeyama K, Kawahara K, Iino S, Otsubo Y, Saigo K, Izumi H, Hashiguchi T, Yamakuchi M, Yamaji K, Endo R, Suzuki K, Imaizumi H, Maruyama I (2003) Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* 38:1167-1177.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Bourrie B, Canat X, Calandra B, Rinaldi-Carmona M, Le Fur G, Casellas P (1995) Activation of mitogen-activated protein kinases by stimulation of the central cannabinoid receptor CB1. *Biochem J* 312 (Pt 2):637-641.
- Bouaboula M, Poinot-Chazel C, Marchand J, Canat X, Bourrie B, Rinaldi-Carmona M, Calandra B, Le Fur G, Casellas P (1996) Signaling pathway associated with stimulation of CB2 peripheral cannabinoid receptor. Involvement of both mitogen-activated protein kinase and induction of Krox-24 expression. *Eur J Biochem* 237:704-711.
- Bouaboula M, Hilairt S, Marchand J, Fajas L, Le Fur G, Casellas P (2005) Anandamide induced PPARgamma transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur J Pharmacol* 517:174-181.
- Boullerne AI, Nedelkoska L, Benjamins JA (1999) Synergism of nitric oxide and iron in killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J Neurochem* 72:1050-1060.
- Breivogel CS, Griffin G, Di Marzo V, Martin BR (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol Pharmacol* 60:155-163.
- Brunner TF (1973) Marijuana in ancient Greece and Rome? The literary evidence. *Bull Hist Med* 47:344-355.
- Burstein SH, Huang SM, Petros TJ, Rossetti RG, Walker JM, Zurier RB (2002) Regulation of anandamide tissue levels by N-arachidonylglycine. *Biochem Pharmacol* 64:1147-1150.
- Busch L, Sterin-Borda L, Borda E (2004) Expression and biological effects of CB1 cannabinoid receptor in rat parotid gland. *Biochem Pharmacol* 68:1767-1774.
- Butovsky O, Talpalar AE, Ben-Yaakov K, Schwartz M (2005) Activation of microglia by aggregated beta-amyloid or lipopolysaccharide impairs MHC-II expression and renders them cytotoxic whereas IFN-gamma and IL-4 render them protective. *Mol Cell Neurosci* 29:381-393.
- Byram SC, Carson MJ, Deboy CA, Serpe CJ, Sanders VM, Jones KJ (2004) CD4-positive T cell-mediated neuroprotection requires dual compartment antigen presentation. *J Neurosci* 24:4333-4339.
- Cabral GA, Lockmuller JC, Mishkin EM (1986) Delta 9-tetrahydrocannabinol decreases alpha/beta interferon response to herpes simplex virus type 2 in the B6C3F1 mouse. *Proc Soc Exp Biol Med* 181:305-311.
- Cabral GA, Toney DM, Fischer-Stenger K, Harrison MP, Marciano-Cabral F (1995) Anandamide inhibits macrophage-mediated killing of tumor necrosis factor-sensitive cells. *Life Sci* 56:2065-2072.
- Cabral GA, Marciano-Cabral F (2005) Cannabinoid receptors in microglia of the central nervous system: immune functional relevance. *J Leukoc Biol* 78:1192-1197.

- Cabral GA, Raborn ES, Griffin L, Dennis J, Marciano-Cabral F (2008) CB(2) receptors in the brain: role in central immune function. *Br J Pharmacol* 153:240-251.
- Cabranes A, Pryce G, Baker D, Fernandez-Ruiz J (2006) Changes in CB1 receptors in motor-related brain structures of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis mice. *Brain Res* 1107:199-205.
- Calignano A, La RG, Giuffrida A, Piomelli D (1998) Control of pain initiation by endogenous cannabinoids. *Nature* 394:277-281.
- Campbell KA, Foster TC, Hampson RE, Deadwyler SA (1986) Effects of delta 9-tetrahydrocannabinol on sensory-evoked discharges of granule cells in the dentate gyrus of behaving rats. *J Pharmacol Exp Ther* 239:941-945.
- Campbell VA, Gowran A (2007) Alzheimer's disease; taking the edge off with cannabinoids? *Br J Pharmacol* 152:655-662.
- Cannella B, Raine CS (1995) The adhesion molecule and cytokine profile of multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 37:424-435.
- Cao C, Matsumura K, Shirakawa N, Maeda M, Jikihara I, Kobayashi S, Watanabe Y (2001) Pyrogenic cytokines injected into the rat cerebral ventricle induce cyclooxygenase-2 in brain endothelial cells and also upregulate their receptors. *Eur J Neurosci* 13:1781-1790.
- Carayon P, Marchand J, Dussosoy D, Derocq JM, Jbilo O, Bord A, Bouaboula M, Galiegue S, Mondiere P, Penarier G, Fur GL, Defrance T, Casellas P (1998) Modulation and functional involvement of CB2 peripheral cannabinoid receptors during B-cell differentiation. *Blood* 92:3605-3615.
- Carlisle SJ, Marciano-Cabral F, Staab A, Ludwick C, Cabral GA (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophages and macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int Immunopharmacol* 2:69-82.
- Carlson NG, Hill KE, Tsunoda I, Fujinami RS, Rose JW (2006) The pathologic role for COX-2 in apoptotic oligodendrocytes in virus induced demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 174:21-31.
- Carrier EJ, Kearn CS, Barkmeier AJ, Breese NM, Yang W, Nithipatikom K, Pfister SL, Campbell WB, Hillard CJ (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol Pharmacol* 65:999-1007.
- Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D (1999) A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature* 398:436-441.
- Caughey GE, Cleland LG, Penglis PS, Gamble JR, James MJ (2001) Roles of cyclooxygenase (COX)-1 and COX-2 in prostanoid production by human endothelial cells: selective up-regulation of prostacyclin synthesis by COX-2. *J Immunol* 167:2831-2838.
- Centonze D, Bari M, Rossi S, Prosperetti C, Furlan R, Fezza F, De Chiara V, Battistini L, Bernardi G, Bernardini S, Martino G, Maccarrone M (2007) The endocannabinoid system is dysregulated in multiple sclerosis and in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 130:2543-2553.
- Chabot S, Williams G, Yong VW (1997) Microglial production of TNF-alpha is induced by activated T lymphocytes. Involvement of VLA-4 and inhibition by interferonbeta-1b. *J Clin Invest* 100:604-612.
- Chan WY, Kohsaka S, Rezaie P (2007) The origin and cell lineage of microglia: new concepts. *Brain Res Rev* 53:344-354.
- Chemin J, Monteil A, Pérez-Reyes E, Nargeot J, Lory P (2001) Direct inhibition of T-type calcium channels by the endogenous cannabinoid anandamide. *EMBO J* 20:7033-7040.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ (2006) Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116:1317-1326.

- Clark AJ, Ware MA, Yazer E, Murray TJ, Lynch ME (2004) Patterns of cannabis use among patients with multiple sclerosis. *Neurology* 62:2098-2100.
- Clatch RJ, Miller SD, Metzner R, Dal Canto MC, Lipton HL (1990) Monocytes/macrophages isolated from the mouse central nervous system contain infectious Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV). *Virology* 176:244-254.
- Clifford DB (1983) Tetrahydrocannabinol for tremor in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 13:669-671.
- Comi G, Filippi M, Barkhof F, Durelli L, Edan G, Fernandez O, Hartung H, Seeldrayers P, Sorensen PS, Rovaris M, Martinelli V, Hommes OR (2001) Effect of early interferon treatment on conversion to definite multiple sclerosis: a randomised study. *Lancet* 357:1576-1582.
- Confavreux C, Aimard G, Devic M (1980) Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain* 103:281-300.
- Consroe P, Musty R, Rein J, Tillery W, Pertwee R (1997) The perceived effects of smoked cannabis on patients with multiple sclerosis. *Eur Neurol* 38:44-48.
- Conti S, Costa B, Colleoni M, Parolaro D, Giagnoni G (2002) Antiinflammatory action of endocannabinoid palmitoylethanolamide and the synthetic cannabinoid nabilone in a model of acute inflammation in the rat. *Br J Pharmacol* 135:181-187.
- Cravatt BF, Giang DK, Mayfield SP, Boger DL, Lerner RA, Gilula NB (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* 384:83-87.
- Croxford JL, Miller SD (2003) Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R+WIN55,212. *J Clin Invest* 111:1231-1240.
- Croxford JL (2003) Therapeutic potential of cannabinoids in CNS disease. *CNS Drugs* 17:179-202.
- Croxford JL, Olson JK, Anger HA, Miller SD (2005) Initiation and exacerbation of autoimmune demyelination of the central nervous system via virus-induced molecular mimicry: implications for the pathogenesis of multiple sclerosis. *J Virol* 79:8581-8590.
- Croxford JL, Yamamura T (2005) Cannabinoids and the immune system: potential for the treatment of inflammatory diseases? *J Neuroimmunol* 166:3-18.
- Croxford JL, Ercolini AM, Degutes M, Miller SD (2006) Structural requirements for initiation of cross-reactivity and CNS autoimmunity with a PLP139-151 mimic peptide derived from murine hepatitis virus. *Eur J Immunol* 36:2671-2680.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
- D'Andrea A, Aste-Amezaga M, Valiante NM, Ma X, Kubin M, Trinchieri G (1993) Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med* 178:1041-1048.
- Dahlberg A, Auble MR, Petro TM (2006) Reduced expression of IL-12 p35 by SJL/J macrophages responding to Theiler's virus infection is associated with constitutive activation of IRF-3. *Virology* 353:422-432.
- Dal Canto MC, Lipton HL (1982) Ultrastructural immunohistochemical localization of virus in acute and chronic demyelinating Theiler's virus infection. *Am J Pathol* 106:20-29.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G, Kim JV, Zuo Y, Jung S, Littman DR, Dustin ML, Gan WB (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8:752-758.
- Davies CA, Loddick SA, Stroemer RP, Hunt J, Rothwell NJ (1998) An integrated analysis of the progression of cell responses induced by permanent focal middle cerebral artery occlusion in the rat. *Exp Neurol* 154:199-212.

- De Groot CJ, Montagne L, Barten AD, Sminia P, Van Der Voorn P (1999) Expression of transforming growth factor (TGF)-beta1, -beta2, and -beta3 isoforms and TGF-beta type I and type II receptors in multiple sclerosis lesions and human adult astrocyte cultures. *J Neuropathol Exp Neurol* 58:174-187.
- de Lago E, Ligresti A, Ortar G, Morera E, Cabranes A, Pryce G, Bifulco M, Baker D, Fernández-Ruiz J, Di M, V (2004) In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur J Pharmacol* 484:249-257.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Davis JB, Pertwee RG, Di Marzo V (2000) Overlap between the ligand recognition properties of the anandamide transporter and the VR1 vanilloid receptor: inhibitors of anandamide uptake with negligible capsaicin-like activity. *FEBS Lett* 483:52-56.
- De Petrocellis L, Bisogno T, Maccarrone M, Davis JB, Finazzi-Agro A, Di Marzo V (2001) The activity of anandamide at vanilloid VR1 receptors requires facilitated transport across the cell membrane and is limited by intracellular metabolism. *J Biol Chem* 276:12856-12863.
- De Petrocellis L, Cascio MG, Di Marzo V (2004) The endocannabinoid system: a general view and latest additions. *Br J Pharmacol* 141:765-774.
- De Simone R, Giampaolo A, Giometto B, Gallo P, Levi G, Peschle C, Aloisi F (1995) The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions. *J Neuropathol Exp Neurol* 54:175-187.
- De Smedt T, Van Mechelen M, De Becker G, Urbain J, Leo O, Moser M (1997) Effect of interleukin-10 on dendritic cell maturation and function. *Eur J Immunol* 27:1229-1235.
- Deadwyler SA, Hampson RE, Mu J, Whyte A, Childers S (1995) Cannabinoids modulate voltage sensitive potassium A-current in hippocampal neurons via a cAMP-dependent process. *J Pharmacol Exp Ther* 273:734-743.
- Demuth DG, Molleman A (2006) Cannabinoid signalling. *Life Sci* 78:549-563.
- Derocq JM, Segui M, Marchand J, Le Fur G, Casellas P (1995) Cannabinoids enhance human B-cell growth at low nanomolar concentrations. *FEBS Lett* 369:177-182.
- Derocq JM, Jbilo O, Bouaboula M, Segui M, Clere C, Casellas P (2000) Genomic and functional changes induced by the activation of the peripheral cannabinoid receptor CB2 in the promyelocytic cells HL-60. Possible involvement of the CB2 receptor in cell differentiation. *J Biol Chem* 275:15621-15628.
- Devane WA, Dysarz FA, III, Johnson MR, Melvin LS, Howlett AC (1988) Determination and characterization of a cannabinoid receptor in rat brain. *Mol Pharmacol* 34:605-613.
- Devane WA, Hanus L, Breuer A, Pertwee RG, Stevenson LA, Griffin G, Gibson D, Mandelbaum A, Etinger A, Mechoulam R (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* 258:1946-1949.
- Di Marzo V, Fontana A, Cadas H, Schinelli S, Cimino G, Schwartz JC, Piomelli D (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* 372:686-691.
- Di Marzo V (1998) 'Endocannabinoids' and other fatty acid derivatives with cannabimimetic properties: biochemistry and possible physiopathological relevance. *Biochim Biophys Acta* 1392:153-175.
- Di Marzo V, Bisogno T, De Petrocellis L, Melck D, Martin BR (1999) Cannabimimetic fatty acid derivatives: the anandamide family and other endocannabinoids. *Curr Med Chem* 6:721-744.
- Di Marzo V, Melck D, Orlando P, Bisogno T, Zagoory O, Bifulco M, Vogel Z, De Petrocellis L (2001) Palmitoylethanolamide inhibits the expression of fatty acid amide hydrolase and enhances the anti-proliferative effect of anandamide in human breast cancer cells. *Biochem J* 358:249-255.
- Di Marzo V, De Petrocellis L, Fezza F, Ligresti A, Bisogno T (2002) Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:377-391.
- Docagne F, Muñetón V, Clemente D, Ali C, Loría F, Correa F, Hernangómez M, Mestre L, Vivien D, Guaza C



(2007) Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: Neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. *Mol Cell Neurosci* 34:551-561.

Drath DB, Shorey JM, Price L, Huber GL (1979) Metabolic and functional characteristics of alveolar macrophages recovered from rats exposed to marijuana smoke. *Infect Immun* 25:268-272.

Drescher KM, Pease LR, Rodriguez M (1997) Antiviral immune responses modulate the nature of central nervous system (CNS) disease in a murine model of multiple sclerosis. *Immunol Rev* 159:177-193.

Dubois RN, Abramson SB, Crofford L, Gupta RA, Simon LS, van de Putte LB, Lipsky PE (1998) Cyclooxygenase in biology and disease. *FASEB J* 12:1063-1073.

Dubois BD, Keenan E, Porter BE, Kapoor R, Rudge P, Thompson AJ, Miller DH, Giovannoni G (2003) Interferon beta in multiple sclerosis: experience in a British specialist multiple sclerosis centre. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 74:946-949.

Eikelenboom P, Veerhuis R, Scheper W, Rozemuller AJ, van Gool WA, Hoozemans JJ (2006) The significance of neuroinflammation in understanding Alzheimer's disease. *J Neural Transm* 113:1685-1695.

Eljaschewitsch E, Witting A, Mawrin C, Lee T, Schmidt PM, Wolf S, Hoertnagl H, Raine CS, Schneider-Stock R, Nitsch R, Ullrich O (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* 49:67-79.

Elward K, Gasque P (2003) "Eat me" and "don't eat me" signals govern the innate immune response and tissue repair in the CNS: emphasis on the critical role of the complement system. *Mol Immunol* 40:85-94.

Enk AH, Angeloni VL, Udey MC, Katz SI (1993) Inhibition of Langerhans cell antigen-presenting function by IL-10. A role for IL-10 in induction of tolerance. *J Immunol* 151:2390-2398.

Ehrhart J, Obregon D, Mori T, Hou H, Sun N, Bai Y, Klein T, Fernandez F, Tan J, Shytle RD (2005) Stimulation of cannabinoid receptor 2 (CB2) suppresses microglial activation. *J Neuroinflammation* 2:29-41.

Esposito G, De FD, Steardo L, Scuderi C, Savani C, Cuomo V, Iuvone T (2006) CB1 receptor selective activation inhibits beta-amyloid-induced iNOS protein expression in C6 cells and subsequently blunts tau protein hyperphosphorylation in co-cultured neurons. *Neurosci Lett* 404:342-346.

Fan P (1995) Cannabinoid agonists inhibit the activation of 5-HT3 receptors in rat nodose ganglion neurons. *J Neurophysiol* 73:907-910.

Farina C, Aloisi F, Meinel E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138-145.

Felder CC, Veluz JS, Williams HL, Briley EM, Matsuda LA (1992) Cannabinoid agonists stimulate both receptor- and non-receptor-mediated signal transduction pathways in cells transfected with and expressing cannabinoid receptor clones. *Mol Pharmacol* 42:838-845.

Feng GJ, Goodridge HS, Harnett MM, Wei XQ, Nikolaev AV, Higson AP, Liew FY (1999) Extracellular signal-related kinase (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophage IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J Immunol* 163:6403-6412.

Fernández O, Fernández V (1986) Esclerosis múltiple . Fundación española de esclerosis múltiple.

Fernández-Muñoz R, Celma-Serrat M (2002) Virus and demyelination: why suspect that a virus may be involved in the aetiology of multiple sclerosis? *Rev Neurol* 35:964-972.

Fernández-Ruiz J, Lastres-Becker I, Cabranes A, González S, Ramos JA (2002) Endocannabinoids and basal ganglia functionality. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:257-267.

Fernández-Solari J, Prestifilippo JP, Bornstein SR, McCann SM, Rettori V (2006) Participation of the endocannabinoid system in the effect of TNF-alpha on hypothalamic release of gonadotropin-releasing hormone. *Ann N Y Acad Sci* 1088:238-250.

- Fezza F, Bisogno T, Minassi A, Appendino G, Mechoulam R, Di Marzo V (2002) Noladin ether, a putative novel endocannabinoid: inactivation mechanisms and a sensitive method for its quantification in rat tissues. *FEBS Lett* 513:294-298.
- Fiorentino DF, Zlotnik A, Vieira P, Mosmann TR, Howard M, Moore KW, O'Garra A (1991) IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *J Immunol* 146:3444-3451.
- Fitch MT, Doller C, Combs CK, Landreth GE, Silver J (1999) Cellular and molecular mechanisms of glial scarring and progressive cavitation: in vivo and in vitro analysis of inflammation-induced secondary injury after CNS trauma. *J Neurosci* 19:8182-8198.
- Fogarty A, Rawstone P, Prestage G, Crawford J, Grierson J, Kippax S (2007) Marijuana as therapy for people living with HIV/AIDS: social and health aspects. *AIDS Care* 19:295-301.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD (1995) Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein-reactive CD4+ T cells compared. *J Immunol* 154:4309-4321.
- Fowler CJ, Jacobsson SO (2002) Cellular transport of anandamide, 2-arachidonoylglycerol and palmitoylethanolamide--targets for drug development? *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:193-200.
- Fowler CJ (2007) The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *Br J Pharmacol* 152:594-601.
- Franc NC, White K, Ezekowitz RA (1999) Phagocytosis and development: back to the future. *Curr Opin Immunol* 11:47-52.
- Franklin A, Parmentier-Batteur S, Walter L, Greenberg DA, Stella N (2003) Palmitoylethanolamide increases after focal cerebral ischemia and potentiates microglial cell motility. *J Neurosci* 23:7767-7775.
- Frohman EM, Frohman TC, Vayuvegula B, Gupta S, van den Noort S (1988) Vasoactive intestinal polypeptide inhibits the expression of the MHC class II antigens on astrocytes. *J Neurol Sci* 88:339-346.
- Galiegue S, Mary S, Marchand J, Dussossoy D, Carriere D, Carayon P, Bouaboula M, Shire D, Le Fur G, Casellas P (1995) Expression of central and peripheral cannabinoid receptors in human immune tissues and leukocyte subpopulations. *Eur J Biochem* 232:54-61.
- Galve-Roperh I, Sánchez C, Cortes ML, del Pulgar TG, Izquierdo M, Guzman M (2000) Anti-tumoral action of cannabinoids: involvement of sustained ceramide accumulation and extracellular signal-regulated kinase activation. *Nat Med* 6:313-319.
- Gardai SJ, Bratton DL, Ogden CA, Henson PM (2006) Recognition ligands on apoptotic cells: a perspective. *J Leukoc Biol* 79:896-903.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology* 49:171-186.
- Gately MK, Renzetti LM, Magram J, Stern AS, Adorini L, Gubler U, Presky DH (1998) The interleukin-12/interleukin-12-receptor system: role in normal and pathologic immune responses. *Annu Rev Immunol* 16:495-521.
- Glaser ST, Abumrad NA, Fatade F, Kaczocha M, Studholme KM, Deutsch DG (2003) Evidence against the presence of an anandamide transporter. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100:4269-4274.
- Glass M, Hong J, Sato TA, Mitchell MD (2005) Misidentification of prostamides as prostaglandins. *J Lipid Res* 46:1364-1368.
- Goparaju SK, Ueda N, Taniguchi K, Yamamoto S (1999) Enzymes of porcine brain hydrolyzing 2-arachidonoylglycerol, an endogenous ligand of cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 57:417-423.
- Gonsette RE (2004) A comparison of benefits of mitoxantrone and other recent therapeutic approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Pharmacother* 5:747-765.

- Graeber MB, López-Redondo F, Ikoma E, Ishikawa M, Imai Y, Nakajima K, Kreutzberg GW, Kohsaka S (1998) The microglia/macrophage response in the neonatal rat facial nucleus following axotomy. *Brain Res* 813:241-253.
- Gran B, Zhang GX, Yu S, Li J, Chen XH, Ventura ES, Kamoun M, Rostami A (2002) IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* 169:7104-7110.
- Gregory CD (2000) CD14-dependent clearance of apoptotic cells: relevance to the immune system. *Curr Opin Immunol* 12:27-34.
- Hailer NP, Grampp A, Nitsch R (1999) Proliferation of microglia and astrocytes in the dentate gyrus following entorhinal cortex lesion: a quantitative bromodeoxyuridine-labelling study. *Eur J Neurosci* 11:3359-3364.
- Hammarberg H, Lidman O, Lundberg C, Eltayeb SY, Gielen AW, Muhallab S, Svenningsson A, Linda H, van Der Meide PH, Cullheim S, Olsson T, Piehl F (2000) Neuroprotection by encephalomyelitis: rescue of mechanically injured neurons and neurotrophin production by CNS-infiltrating T and natural killer cells. *J Neurosci* 20:5283-5291.
- Hansen HS, Moesgaard B, Hansen HH, Petersen G (2000) N-Acylethanolamines and precursor phospholipids - relation to cell injury. *Chem Phys Lipids* 108:135-150.
- Harizi H, Norbert G (2004) Inhibition of IL-6, TNF-alpha, and cyclooxygenase-2 protein expression by prostaglandin E2-induced IL-10 in bone marrow-derived dendritic cells. *Cell Immunol* 228:99-109.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR, Turner H, Murphy TL, Murphy KM, Weaver CT (2005) Interleukin 17-producing CD4<sup>+</sup> effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nat Immunol* 6:1123-1132.
- Hauben E, Nevo U, Yoles E, Moalem G, Agranov E, Mor F, Akselrod S, Neeman M, Cohen IR, Schwartz M (2000) Autoimmune T cells as potential neuroprotective therapy for spinal cord injury. *Lancet* 355:286-287.
- Häusler KG, Prinz M, Nolte C, Weber JR, Schumann RR, Kettenmann H, Hanisch UK (2002) Interferon-gamma differentially modulates the release of cytokines and chemokines in lipopolysaccharide- and pneumococcal cell wall-stimulated mouse microglia and macrophages. *Eur J Neurosci* 16:2113-2122.
- Hayes P, Meadows HJ, Gunthorpe MJ, Harries MH, Duckworth DM, Cairns W, Harrison DC, Clarke CE, Ellington K, Prinjha RK, Barton AJ, Medhurst AD, Smith GD, Topp S, Murdock P, Sanger GJ, Terett J, Jenkins O, Benham CD, Randall AD, Gloger IS, Davis JB (2000) Cloning and functional expression of a human orthologue of rat vanilloid receptor-1. *Pain* 88:205-215.
- Hendrix S, Nitsch R (2007) The role of T helper cells in neuroprotection and regeneration. *J Neuroimmunol* 184:100-112.
- Henry DJ, Chavkin C (1995) Activation of inwardly rectifying potassium channels (GIRK1) by co-expressed rat brain cannabinoid receptors in *Xenopus* oocytes. *Neurosci Lett* 186:91-94.
- Herkenham M, Lynn AB, Little MD, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1990) Cannabinoid receptor localization in brain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87:1932-1936.
- Herkenham M, Lynn AB, Johnson MR, Melvin LS, de Costa BR, Rice KC (1991) Characterization and localization of cannabinoid receptors in rat brain: a quantitative in vitro autoradiographic study. *J Neurosci* 11:563-583.
- Hewett SJ, Corbett JA, McDaniel ML, Choi DW (1993) Interferon-gamma and interleukin-1 beta induce nitric oxide formation from primary mouse astrocytes. *Neurosci Lett* 164:229-232.
- Hickey WF, Kimura H (1988) Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science* 239:290-292.
- Hickey WF (2001) Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36:118-124.
- Hidding U, Mielke K, Waetzig V, Brecht S, Hanisch U, Behrens A, Wagner E, Herdegen T (2002) The c-Jun N-

- terminal kinases in cerebral microglia: immunological functions in the brain. *Biochem Pharmacol* 64:781-788.
- Hillard CJ, Edgmond WS, Jarrahan A, Campbell WB (1997) Accumulation of N-arachidonylethanolamine (anandamide) into cerebellar granule cells occurs via facilitated diffusion. *J Neurochem* 69:631-638.
- Hillard CJ, Jarrahan A (2003) Cellular accumulation of anandamide: consensus and controversy. *Br J Pharmacol* 140:802-808.
- Hoek RM, Ruuls SR, Murphy CA, Wright GJ, Goddard R, Zurawski SM, Blom B, Homola ME, Streit WJ, Brown MH, Barclay AN, Sedgwick JD (2000) Down-regulation of the macrophage lineage through interaction with OX2 (CD200). *Science* 290:1768-1771.
- Homey B, Dieu-Nosjean MC, Wiesenborn A, Massacrier C, Pin JJ, Oldham E, Catron D, Buchanan ME, Muller A, deWaal Malefyt R, Deng G, Orozco R, Ruzicka T, Lehmann P, Lebecque S, Caux C, Zlotnik A (2000) Up-regulation of macrophage inflammatory protein-3  $\alpha$ /CCL20 and CC chemokine receptor 6 in psoriasis. *J Immunol* 164:6621-6632.
- Howlett AC, Fleming RM (1984) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Pharmacology of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 26:532-538.
- Howlett AC (1985) Cannabinoid inhibition of adenylate cyclase. Biochemistry of the response in neuroblastoma cell membranes. *Mol Pharmacol* 27:429-436.
- Howlett AC, Johnson MR, Melvin LS, Milne GM (1988) Nonclassical cannabinoid analgetics inhibit adenylate cyclase: development of a cannabinoid receptor model. *Mol Pharmacol* 33:297-302.
- Howlett AC, Champion TM, Wilken GH, Mechoulam R (1990) Stereochemical effects of 11-OH- $\Delta^8$ -tetrahydrocannabinol-dimethylheptyl to inhibit adenylate cyclase and bind to the cannabinoid receptor. *Neuropharmacology* 29:161-165.
- Howlett AC (2002) The cannabinoid receptors. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* 68-69:619-631.
- Hulshof S, Montagne L, De Groot CJ, Van Der V (2002) Cellular localization and expression patterns of interleukin-10, interleukin-4, and their receptors in multiple sclerosis lesions. *Glia* 38:24-35.
- Imler JL, Hoffmann JA (2002) Toll receptors in Drosophila: a family of molecules regulating development and immunity. *Curr Top Microbiol Immunol* 270:63-79.
- Ishizu T, Minohara M, Ichiyama T, Kira R, Tanaka M, Osoegawa M, Hara T, Furukawa S, Kira J (2006) CSF cytokine and chemokine profiles in acute disseminated encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 175:52-58.
- Itoyama Y, Sternberger NH, Webster HD, Quarles RH, Cohen SR, Richardson EP, Jr. (1980) Immunocytochemical observations on the distribution of myelin-associated glycoprotein and myelin basic protein in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 7:167-177.
- Iuvone T, Esposito G, Esposito R, Santamaria R, Di Rosa M, Izzo AA (2004) Neuroprotective effect of cannabidiol, a non-psychoactive component from Cannabis sativa, on beta-amyloid-induced toxicity in PC12 cells. *J Neurochem* 89:134-141.
- Iversen L (2005) Long-term effects of exposure to cannabis. *Curr Opin Pharmacol* 5:69-72.
- Jackson SJ, Diemel LT, Pryce G, Baker D (2005) Cannabinoids and neuroprotection in CNS inflammatory disease. *J Neurol Sci* 233:21-25.
- Jacobs LD, Beck RW, Simon JH, Kinkel RP, Brownschidle CM, Murray TJ, Simonian NA, Slasor PJ, Sandrock AW (2000) Intramuscular interferon beta-1a therapy initiated during a first demyelinating event in multiple sclerosis. CHAMPS Study Group. *N Engl J Med* 343:898-904.
- Jacobson NG, Szabo SJ, Weber-Nordt RM, Zhong Z, Schreiber RD, Darnell JE, Jr., Murphy KM (1995) Interleukin 12 signaling in T helper type 1 (Th1) cells involves tyrosine phosphorylation of signal transducer and activator of transcription (Stat)3 and Stat4. *J Exp Med* 181:1755-1762.
- Jain AK, Ryan JR, McMahon FG, Smith G (1981) Evaluation of intramuscular levonantradol and placebo in

acute postoperative pain. *J Clin Pharmacol* 21:320S-326S.

Jarai Z, Wagner JA, Varga K, Lake KD, Compton DR, Martin BR, Zimmer AM, Bonner TI, Buckley NE, Mezey E, Razdan RK, Zimmer A, Kunos G (1999) Cannabinoid-induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:14136-14141.

Jelachich ML, Bandyopadhyay P, Blum K, Lipton HL (1995) Theiler's virus growth in murine macrophage cell lines depends on the state of differentiation. *Virology* 209:437-444.

Jensen MB, Hegelund IV, Lomholt ND, Finsen B, Owens T (2000) IFNgamma enhances microglial reactions to hippocampal axonal degeneration. *J Neurosci* 20:3612-3621.

Jeon YJ, Yang KH, Pulaski JT, Kaminski NE (1996) Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor- kappa B/Rel activation. *Mol Pharmacol* 50:334-341.

Jhaveri MD, Sagar DR, Elmes SJ, Kendall DA, Chapman V (2007) Cannabinoid CB2 receptor-mediated antinociception in models of acute and chronic pain. *Mol Neurobiol* 36:26-35.

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, Myers LW, Panitch HS, Rose JW, Schiffer RB, Vollmer T, Weiner LP, Wolinsky JS (1998) Extended use of glatiramer acetate (Copaxone) is well tolerated and maintains its clinical effect on multiple sclerosis relapse rate and degree of disability. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology* 50:701-708.

Jones RT (2002) Cardiovascular system effects of marijuana. *J Clin Pharmacol* 42:58S-63S.

Kaminski NE (1998) Regulation of the cAMP cascade, gene expression and immune function by cannabinoid receptors. *J Neuroimmunol* 83:124-132.

Kang B, Kang HK, Kim BS (2005) Identification of capsid epitopes of Theiler's virus recognized by CNS-infiltrating CD4+ T cells from virus-infected C57BL/6 mice. *Virus Res* 108:57-61.

Katz-Levy Y, Neville KL, Padilla J, Rahbe S, Begolka WS, Girvin AM, Olson JK, Vanderlugt CL, Miller SD (2000) Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J Immunol* 165:5304-5314.

Kawanokuchi J, Shimizu K, Nitta A, Yamada K, Mizuno T, Takeuchi H, Suzumura A (2007) Production and functions of IL-17 in microglia. *J Neuroimmunol*.

Keller CC, Yamo O, Ouma C, Ong'echa JM, Ounah D, Hittner JB, Vulule JM, Perkins DJ (2006) Acquisition of hemozoin by monocytes down-regulates interleukin-12 p40 (IL-12p40) transcripts and circulating IL-12p70 through an IL-10-dependent mechanism: in vivo and in vitro findings in severe malarial anemia. *Infect Immun* 74:5249-5260.

Kerschensteiner M, Gallmeier E, Behrens L, Leal VV, Misgeld T, Klinkert WE, Kolbeck R, Hoppe E, Oropeza-Wekerle RL, Bartke I, Stadelmann C, Lassmann H, Wekerle H, Hohlfeld R (1999) Activated human T cells, B cells, and monocytes produce brain-derived neurotrophic factor in vitro and in inflammatory brain lesions: a neuroprotective role of inflammation? *J Exp Med* 189:865-870.

Kim L, Del Río L, Butcher BA, Mogensen TH, Paludan SR, Flavell RA, Denkers EY (2005) p38 MAPK autophosphorylation drives macrophage IL-12 production during intracellular infection. *J Immunol* 174:4178-4184.

Kim SR, Chung YC, Chung ES, Park KW, Won SY, Bok E, Park ES, Jin BK (2007) Roles of transient receptor potential vanilloid subtype 1 and cannabinoid type 1 receptors in the brain: neuroprotection versus neurotoxicity. *Mol Neurobiol* 35:245-254.

Kipnis J, Yoles E, Porat Z, Cohen A, Mor F, Sela M, Cohen IR, Schwartz M (2000) T cell immunity to copolymer 1 confers neuroprotection on the damaged optic nerve: possible therapy for optic neuropathies. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:7446-7451.

Klein TW, Newton CA, Widen R, Friedman H (1985) The effect of delta-9-tetrahydrocannabinol and 11-hydroxy-delta-9-tetrahydrocannabinol on T-lymphocyte and B-lymphocyte mitogen responses. *J*

Immunopharmacol 7:451-466.

Klein TW, Friedman H, Specter S (1998) Marijuana, immunity and infection. *J Neuroimmunol* 83:102-115.

Klein TW, Newton CA, Nakachi N, Friedman H (2000) Delta 9-tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J Immunol* 164:6461-6466.

Klein TW, Newton C, Larsen K, Lu L, Perkins I, Nong L, Friedman H (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J Leukoc Biol* 74:486-496.

Klein TW (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat Rev Immunol* 5:400-411.

Kofalvi A, Pereira MF, Rebola N, Rodrigues RJ, Oliveira CR, Cunha RA (2007) Anandamide and NADA bi-directionally modulate presynaptic Ca<sup>2+</sup> levels and transmitter release in the hippocampus. *Br J Pharmacol* 151:551-563.

Kohji T, Tanuma N, Aikawa Y, Kawazoe Y, Suzuki Y, Kohyama K, Matsumoto Y (1998) Interaction between apoptotic cells and reactive brain cells in the central nervous system of rats with autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 82:168-174.

Kozak KR, Marnett LJ (2002) Oxidative metabolism of endocannabinoids. Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids 66:211-220.

Kreutzberg GW (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci* 19:312-318.

Kurasawa K, Hirose K, Sano H, Endo H, Shinkai H, Nawata Y, Takabayashi K, Iwamoto I (2000) Increased interleukin-17 production in patients with systemic sclerosis. *Arthritis Rheum* 43:2455-2463.

Kurtzke JF (1980) Geographic distribution of multiple sclerosis: An update with special reference to Europe and the Mediterranean region. *Acta Neurol Scand* 62:65-80.

la Sala A, Gadina M, Kelsall BL (2005) G(i)-protein-dependent inhibition of IL-12 production is mediated by activation of the phosphatidylinositol 3-kinase-protein 3 kinase B/Akt pathway and JNK. *J Immunol* 175:2994-2999.

Lambert DM, Fowler CJ (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J Med Chem* 48:5059-5087.

Lan R, Liu Q, Fan P, Lin S, Fernando SR, McCallion D, Pertwee R, Makriyannis A (1999) Structure-activity relationships of pyrazole derivatives as cannabinoid receptor antagonists. *J Med Chem* 42:769-776.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.

Lassmann H (1998) Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 4:93-98.

Lastres-Becker I, De Miguel R, De Petrocellis L, Makriyannis A, Di Marzo V, Fernández-Ruiz J (2003) Compounds acting at the endocannabinoid and/or endovanilloid systems reduce hyperkinesia in a rat model of Huntington's disease. *J Neurochem* 84:1097-1109.

Lau RJ, Tubergen DG, Barr M, Jr., Domino EF, Benowitz N, Jones RT (1976) Phytohemagglutinin-induced lymphocyte transformation in humans receiving delta9-tetrahydrocannabinol. *Science* 192:805-807.

Lawson LJ, Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39:151-170.

Lee M, Yang KH, Kaminski NE (1995) Effects of putative cannabinoid receptor ligands, anandamide and 2-arachidonyl-glycerol, on immune function in B6C3F1 mouse splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 275:529-536.

Lee SC, Collins M, Vanguri P, Shin ML (1992) Glutamate differentially inhibits the expression of class II MHC antigens on astrocytes and microglia. *J Immunol* 148:3391-3397.

- Li J, Gran B, Zhang GX, Ventura ES, Siglienti I, Rostami A, Kamoun M (2003) Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J Neurol Sci* 215:95-103.
- Li X, Kaminski NE, Fischer LJ (2001) Examination of the immunosuppressive effect of delta9-tetrahydrocannabinol in streptozotocin-induced autoimmune diabetes. *Int Immunopharmacol* 1:699-712.
- Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX (2007) Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130:490-501.
- Lichtman AH, Dimen KR, Martin BR (1995) Systemic or intrahippocampal cannabinoid administration impairs spatial memory in rats. *Psychopharmacology (Berl)* 119:282-290.
- Lichtman AH, Hawkins EG, Griffin G, Cravatt BF (2002) Pharmacological activity of fatty acid amides is regulated, but not mediated, by fatty acid amide hydrolase in vivo. *J Pharmacol Exp Ther* 302:73-79.
- Ligresti A, Moriello AS, Starowicz K, Matias I, Pisanti S, De Petrocellis L, Laezza C, Portella G, Bifulco M, Di Marzo V (2006) Antitumor activity of plant cannabinoids with emphasis on the effect of cannabidiol on human breast carcinoma. *J Pharmacol Exp Ther* 318:1375-1387.
- Lindsley MD, Rodriguez M (1989) Characterization of the inflammatory response in the central nervous system of mice susceptible or resistant to demyelination by Theiler's virus. *J Immunol* 142:2677-2682.
- Lipton HL, Dal Canto MC (1976) Chronic neurologic disease in Theiler's virus infection of SJL/J mice. *J Neurol Sci* 30:201-207.
- Lipton HL, Jelachich ML (1997) Molecular pathogenesis of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease in mice. *Intervirology* 40:143-152.
- Liu J, Batkai S, Pacher P, Harvey-White J, Wagner JA, Cravatt BF, Gao B, Kunos G (2003) Lipopolysaccharide induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/phosphoinositide 3-kinase/NF-kappaB independently of platelet-activating factor. *J Biol Chem* 278:45034-45039.
- López-Rodríguez ML, Viso A, Ortega-Gutiérrez S, Lastres-Becker I, González S, Fernández-Ruiz J, Ramos JA (2001) Design, synthesis and biological evaluation of novel arachidonic acid derivatives as highly potent and selective endocannabinoid transporter inhibitors. *J Med Chem* 44:4505-4508.
- Lu T, Newton C, Perkins I, Friedman H, Klein TW (2006) Cannabinoid treatment suppresses the T-helper cell-polarizing function of mouse dendritic cells stimulated with *Legionella pneumophila* infection. *J Pharmacol Exp Ther* 319:269-276.
- Lublin FD, Reingold SC (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology* 46:907-911.
- Ludwin SK, Johnson ES (1981) Evidence for a "dying-back" gliopathy in demyelinating disease. *Ann Neurol* 9:301-305.
- Luo Q, Ma X, Wahl SM, Bieker JJ, Crossley M, Montaner LJ (2004) Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid Kruppel-like factor in macrophages. *J Biol Chem* 279:18451-18456.
- Luo YD, Patel MK, Wiederhold MD, Ou DW (1992) Effects of cannabinoids and cocaine on the mitogen-induced transformations of lymphocytes of human and mouse origins. *Int J Immunopharmacol* 14:49-56.
- Lyman WD, Sonett JR, Brosnan CF, Elkin R, Bornstein MB (1989) Delta 9-tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 23:73-81.
- Maccarrone M, van der Stelt M, Rossi A, Veldink GA, Vliegthart JF, Agro AF (1998) Anandamide hydrolysis by human cells in culture and brain. *J Biol Chem* 273:32332-32339.
- Maccarrone M, De Petrocellis L, Bari M, Fezza F, Salvati S, Di Marzo V, Finazzi-Agro A (2001) Lipopolysaccharide downregulates fatty acid amide hydrolase expression and increases anandamide levels in human peripheral lymphocytes. *Arch Biochem Biophys* 393:321-328.

- Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD (2003) Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 144:68-79.
- Mackie K, Hille B (1992) Cannabinoids inhibit N-type calcium channels in neuroblastoma-glioma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89:3825-3829.
- Mackie K, Lai Y, Westenbroek R, Mitchell R (1995) Cannabinoids activate an inwardly rectifying potassium conductance and inhibit Q-type calcium currents in AtT20 cells transfected with rat brain cannabinoid receptor. *J Neurosci* 15:6552-6561.
- Mailleux P, Vanderhaeghen JJ (1992) Localization of cannabinoid receptor in the human developing and adult basal ganglia. Higher levels in the striatonigral neurons. *Neurosci Lett* 148:173-176.
- Makhoulouf K, Weiner HL, Khoury SJ (2001) Increased percentage of IL-12+ monocytes in the blood correlates with the presence of active MRI lesions in MS. *J Neuroimmunol* 119:145-149.
- Malan TP, Jr., Ibrahim MM, Deng H, Liu Q, Mata HP, Vanderah T, Porreca F, Makriyannis A (2001) CB2 cannabinoid receptor-mediated peripheral antinociception. *Pain* 93:239-245.
- Malfait AM, Gallily R, Sumariwalla PF, Malik AS, Andreaskos E, Mechoulam R, Feldmann M (2000) The nonpsychoactive cannabis constituent cannabidiol is an oral anti-arthritis therapeutic in murine collagen-induced arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:9561-9566.
- Mann PE, Cohen AB, Finley TN, Ladman AJ (1971) Alveolar macrophages. Structural and functional differences between nonsmokers and smokers of marijuana and tobacco. *Lab Invest* 25:111-120.
- Manzanares J, Corchero J, Romero J, Fernández-Ruiz JJ, Ramos JA, Fuentes JA (1999) Pharmacological and biochemical interactions between opioids and cannabinoids. *Trends Pharmacol Sci* 20:287-294.
- Marciano-Cabral F, Cabral G (2003) *Acanthamoeba* spp. as agents of disease in humans. *Clin Microbiol Rev* 16:273-307.
- Maresz K, Carrier EJ, Ponomarev ED, Hillard CJ, Dittel BN (2005) Modulation of the cannabinoid CB2 receptor in microglial cells in response to inflammatory stimuli. *J Neurochem* 95:437-445.
- Maresz K, Pryce G, Ponomarev ED, Marsicano G, Croxford JL, Shriver LP, Ledent C, Cheng X, Carrier EJ, Mann MK, Giovannoni G, Pertwee RG, Yamamura T, Buckley NE, Hillard CJ, Lutz B, Baker D, Dittel BN (2007) Direct suppression of CNS autoimmune inflammation via the cannabinoid receptor CB1 on neurons and CB2 on autoreactive T cells. *Nat Med* 13:492-497.
- Martín-Saavedra FM, Flores N, Dorado B, Eguiluz C, Bravo B, García-Merino A, Ballester S (2007) Beta-interferon unbalances the peripheral T cell proinflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Mol Immunol* 44:3597-3607.
- Martin M, Schifferle RE, Cuesta N, Vogel SN, Katz J, Michalek SM (2003) Role of the phosphatidylinositol 3 kinase-Akt pathway in the regulation of IL-10 and IL-12 by *Porphyromonas gingivalis* lipopolysaccharide. *J Immunol* 171:717-725.
- Massa F, Monory K (2006) Endocannabinoids and the gastrointestinal tract. *J Endocrinol Invest* 29:47-57.
- Matias I, Chen J, De Petrocellis L, Bisogno T, Ligresti A, Fezza F, Krauss AH, Shi L, Protzman CE, Li C, Liang Y, Nieves AL, Kedzie KM, Burk RM, Di Marzo V, Woodward DF (2004) Prostaglandin ethanolamides (prostamides): in vitro pharmacology and metabolism. *J Pharmacol Exp Ther* 309:745-757.
- Matsuda LA, Lolait SJ, Brownstein MJ, Young AC, Bonner TI (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* 346:561-564.
- Matthys P, Vermeire K, Mitera T, Heremans H, Huang S, Billiau A (1998) Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 28:2143-2151.
- Maurer M, Henn V, Dittrich A, Hofmann A (1990) Delta-9-tetrahydrocannabinol shows antispastic and analgesic



effects in a single case double-blind trial. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* 240:1-4.

McCarthy KD, de Vellis J (1980) Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J Cell Biol* 85:890-902.

McCarty MF (2006) Down-regulation of microglial activation may represent a practical strategy for combating neurodegenerative disorders. *Med Hypotheses* 67:251-269.

McCoy KL, Matveyeva M, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB2 receptor participation. *J Pharmacol Exp Ther* 289:1620-1625.

McFarland HF, Greenstein J, McFarlin DE, Eldridge R, Xu XH, Krebs H (1984) Family and twin studies in multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci* 436:118-124.

McGavern DB, Murray PD, Rodriguez M (1999) Quantitation of spinal cord demyelination, remyelination, atrophy, and axonal loss in a model of progressive neurologic injury. *J Neurosci Res* 58:492-504.

McGavern DB, Murray PD, Rivera-Quinones C, Schmelzer JD, Low PA, Rodriguez M (2000) Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* 123 Pt 3:519-531.

McIntyre KW, Shuster DJ, Gillooly KM, Warriar RR, Connaughton SE, Hall LB, Arp LH, Gately MK, Magram J (1996) Reduced incidence and severity of collagen-induced arthritis in interleukin-12-deficient mice. *Eur J Immunol* 26:2933-2938.

McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005) Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:335-339.

Mechoulam R, Gaoni Y (1965) A total synthesis of DL-Delta-1-Tetrahydrocannabinol, the active constituent of Hashish. *J Am Chem Soc* 87:3273-3275.

Mechoulam R, Breuer A, Jarbe TU, Hiltunen AJ, Glaser R (1990) Cannabimimetic activity of novel enantiomeric, benzofuran cannabinoids. *J Med Chem* 33:1037-1043.

Mechoulam R, Ben-Shabat S, Hanus L, Ligumsky M, Kaminski NE, Schatz AR, Gopher A, Almog S, Martin BR, Compton DR, . (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem Pharmacol* 50:83-90.

Mechoulam R, Hanus L (2000) A historical overview of chemical research on cannabinoids. *Chem Phys Lipids* 108:1-13.

Mechoulam R, Panikashvili D, Shohami E (2002) Cannabinoids and brain injury: therapeutic implications. *Trends Mol Med* 8:58-61.

Medana I, Li Z, Flugel A, Tschopp J, Wekerle H, Neumann H (2001) Fas ligand (CD95L) protects neurons against perforin-mediated T lymphocyte cytotoxicity. *J Immunol* 167:674-681.

Medzhitov R, Janeway CA, Jr. (2002) Decoding the patterns of self and nonself by the innate immune system. *Science* 296:298-300.

Meinck HM, Schonle PW, Conrad B (1989) Effect of cannabinoids on spasticity and ataxia in multiple sclerosis. *J Neurol* 236:120-122.

Merzouki A, Mesa JM (2002) Concerning kif, a *Cannabis sativa* L. preparation smoked in the Rif mountains of northern Morocco. *J Ethnopharmacol* 81:403-406.

Mestre L, Correa F, Docagne F, Clemente D, Guaza C (2006) The synthetic cannabinoid WIN 55,212-2 increases COX-2 expression and PGE2 release in murine brain-derived endothelial cells following Theiler's virus infection. *Biochem Pharmacol* 72:869-880.

Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, Willmer-Hulme AJ, Dalton CM, Miszkiel KA, O'Connor PW (2003) A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 348:15-23.

- Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Yauch RL, Neville KL, Katz-Levy Y, Carrizosa A, Kim BS (1997) Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat Med* 3:1133-1136.
- Minghetti L (2004) Cyclooxygenase-2 (COX-2) in inflammatory and degenerative brain diseases. *J Neuropathol Exp Neurol* 63:901-910.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Vinters HV, Akers MA, Schmid I, Uittenbogaart C, Merrill JE (1995) Nitric oxide induces necrotic but not apoptotic cell death in oligodendrocytes. *Neuroscience* 65:531-539.
- Moalem G, Leibowitz-Amit R, Yoles E, Mor F, Cohen IR, Schwartz M (1999) Autoimmune T cells protect neurons from secondary degeneration after central nervous system axotomy. *Nat Med* 5:49-55.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Guaza C (2001) LPS/IFN-gamma cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur J Neurosci* 13:493-502.
- Molina-Holgado E, Arévalo-Martín A, Castrillo A, Bosca L, Vela JM, Guaza C (2002a) Interleukin-4 and interleukin-10 modulate nuclear factor kappaB activity and nitric oxide synthase-2 expression in Theiler's virus-infected brain astrocytes. *J Neurochem* 81:1242-1252.
- Molina-Holgado E, Vela JM, Arévalo-Martín A, Almazán G, Molina-Holgado F, Borrell J, Guaza C (2002b) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J Neurosci* 22:9742-9753.
- Molina-Holgado F, Lledo A, Guaza C (1997) Anandamide suppresses nitric oxide and TNF-alpha responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* 8:1929-1933.
- Molina-Holgado F, Pinteaux E, Moore JD, Molina-Holgado E, Guaza C, Gibson RM, Rothwell NJ (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J Neurosci* 23:6470-6474.
- Moolwaney AS, Igwe OJ (2005) Regulation of the cyclooxygenase-2 system by interleukin-1beta through mitogen-activated protein kinase signaling pathways: a comparative study of human neuroglioma and neuroblastoma cells. *Brain Res Mol Brain Res* 137:202-212.
- Moore FG, Wolfson C (2002) Human herpes virus 6 and multiple sclerosis. *Acta Neurol Scand* 106:63-83.
- Moore KW, O'Garra A, de Waal Malefyt R, Vieira P, Mosmann TR (1993) Interleukin-10. *Annu Rev Immunol* 11:165-190.
- Muccioli GG, Xu C, Odah E, Cudaback E, Cisneros JA, Lambert DM, López Rodríguez ML, Bajjalieh S, Stella N (2007) Identification of a novel endocannabinoid-hydrolyzing enzyme expressed by microglial cells. *J Neurosci* 27:2883-2889.
- Munro S, Thomas KL, Abu-Shaar M (1993) Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature* 365:61-65.
- Murphy CA, Langrish CL, Chen Y, Blumenschein W, McClanahan T, Kastelein RA, Sedgwick JD, Cua DJ (2003) Divergent pro- and antiinflammatory roles for IL-23 and IL-12 in joint autoimmune inflammation. *J Exp Med* 198:1951-1957.
- Murray PD, Pavelko KD, Leibowitz J, Lin X, Rodriguez M (1998) CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J Virol* 72:7320-7329.
- Muzio L, Martino G, Furlan R (2007) Multifaceted aspects of inflammation in multiple sclerosis: the role of microglia. *J Neuroimmunol* 191:39-44.
- Nahas GG, Suciú-Foca N, Armand JP, Morishima A (1974) Inhibition of cellular mediated immunity in marihuana smokers. *Science* 183:419-420.
- Nakano Y, Pross SH, Friedman H (1992) Modulation of interleukin 2 activity by delta 9-tetrahydrocannabinol after stimulation with concanavalin A, phytohemagglutinin, or anti-CD3 antibody. *Proc Soc Exp Biol Med*

201:165-168.

Nava F, Carta G, Colombo G, Gessa GL (2001) Effects of chronic Delta(9)-tetrahydrocannabinol treatment on hippocampal extracellular acetylcholine concentration and alternation performance in the T-maze. *Neuropharmacology* 41:392-399.

Neovius M, Johansson K, Rossner S (2008) Head-to-head studies evaluating efficacy of pharmacotherapy for obesity: a systematic review and meta-analysis. *Obes Rev*.

Neuhaus O, Archelos JJ, Hartung HP (2003) Immunomodulation in multiple sclerosis: from immunosuppression to neuroprotection. *Trends Pharmacol Sci* 24:131-138.

Neumann H, Wekerle H (1998) Neuronal control of the immune response in the central nervous system: linking brain immunity to neurodegeneration. *J Neuropathol Exp Neurol* 57:1-9.

Nguyen MD, Julien JP, Rivest S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nat Rev Neurosci* 3:216-227.

Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science* 308:1314-1318.

Noske K, Bilzer T, Planz O, Stitz L (1998) Virus-specific CD4<sup>+</sup> T cells eliminate borna disease virus from the brain via induction of cytotoxic CD8<sup>+</sup> T cells. *J Virol* 72:4387-4395.

Notcutt W (2000) Improving the debate on cannabis. Let's find out whether cannabis has therapeutic value. *BMJ* 320:1671.

Noyes RJr., Brunk SF, Avery DA, Canter AC (1975) The analgesic properties of delta-9-tetrahydrocannabinol and codeine. *Clin Pharmacol Ther* 18:84-89.

Núñez E, Benito C, Pazos MR, Barbachano A, Fajardo O, González S, Tolón RM, Romero J (2004) Cannabinoid CB2 receptors are expressed by perivascular microglial cells in the human brain: an immunohistochemical study. *Synapse* 53:208-213.

O'Sullivan SE (2007) Cannabinoids go nuclear: evidence for activation of peroxisome proliferator-activated receptors. *Br J Pharmacol* 152:576-582.

Offertáler L, Mo FM, Batkai S, Liu J, Begg M, Razdan RK, Martin BR, Bukoski RD, Kunos G (2003) Selective ligands and cellular effectors of a G protein-coupled endothelial cannabinoid receptor. *Mol Pharmacol* 63:699-705.

Oleszak EL, Katsetos CD, Kuzmak J, Varadhachary A (1997) Inducible nitric oxide synthase in Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Virol* 71:3228-3235.

Oleszak EL, Chang JR, Friedman H, Katsetos CD, Platsoucas CD (2004) Theiler's virus infection: a model for multiple sclerosis. *Clin Microbiol Rev* 17:174-207.

Olson JK, Girvin AM, Miller SD (2001) Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J Virol* 75:9780-9789.

Olson JK, Eagar TN, Miller SD (2002) Functional activation of myelin-specific T cells by virus-induced molecular mimicry. *J Immunol* 169:2719-2726.

Olson JK, Ercolini AM, Miller SD (2005) A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *Curr Top Microbiol Immunol* 296:39-53.

Onaivi ES, Ishiguro H, Gong JP, Patel S, Perchuk A, Meozzi PA, Myers L, Mora Z, Tagliaferro P, Gardner E, Brusco A, Akinshola BE, Liu QR, Hope B, Iwasaki S, Arinami T, Teasensitz L, Uhl GR (2006) Discovery of the presence and functional expression of cannabinoid CB2 receptors in brain. *Ann N Y Acad Sci* 1074:514-536.

Oppmann B, Lesley R, Blom B, Timans JC, Xu Y, Hunte B, Vega F, Yu N, Wang J, Singh K, Zonin F, Vaisberg E, Churakova T, Liu M, Gorman D, Wagner J, Zurawski S, Liu Y, Abrams JS, Moore KW, Rennick D, de Waal-Malefyt R, Hannum C, Bazan JF, Kastelein RA (2000) Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine,

IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity* 13:715-725.

Ortar G, Ligresti A, De Petrocellis L, Morera E, Di Marzo V (2003) Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem Pharmacol* 65:1473-1481.

Ortega-Gutiérrez S, Molina-Holgado E, Guaza C (2005) Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* 52:163-168.

Ousman SS, David S (2001) MIP-1alpha, MCP-1, GM-CSF, and TNF-alpha control the immune cell response that mediates rapid phagocytosis of myelin from the adult mouse spinal cord. *J Neurosci* 21:4649-4656.

Pacher P, Batkai S, Kunos G (2005) Blood pressure regulation by endocannabinoids and their receptors. *Neuropharmacology* 48:1130-1138.

Page SA, Verhoef MJ, Stebbins RA, Metz LM, Levy JC (2003) Cannabis use as described by people with multiple sclerosis. *Can J Neurol Sci* 30:201-205.

Panikashvili D, Simeonidou C, Ben-Shabat S, Hanus L, Breuer A, Mechoulam R, Shohami E (2001) An endogenous cannabinoid (2-AG) is neuroprotective after brain injury. *Nature* 413:527-531.

Parham C, Chirica M, Timans J, Vaisberg E, Travis M, Cheung J, Pflanz S, Zhang R, Singh KP, Vega F, To W, Wagner J, O'Farrell AM, McClanahan T, Zurawski S, Hannum C, Gorman D, Rennick DM, Kastelein RA, de Waal-Malefyt R, Moore KW (2002) A receptor for the heterodimeric cytokine IL-23 is composed of IL-12Rbeta1 and a novel cytokine receptor subunit, IL-23R. *J Immunol* 168:5699-5708.

Parnaik R, Raff MC, Scholes J (2000) Differences between the clearance of apoptotic cells by professional and non-professional phagocytes. *Curr Biol* 10:857-860.

Parolaro D, Massi P, Rubino T, Monti E (2002) Endocannabinoids in the immune system and cancer. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:319-332.

Pena Rossi C, McAllister A, Fiette L, Brahic M (1991) Theiler's virus infection induces a specific cytotoxic T lymphocyte response. *Cell Immunol* 138:341-348.

Peng JC, Abu BS, Richardson MM, Jonsson JJ, Frazer IH, Nielsen LK, Morahan G, Thomas R (2006) IL10 and IL12B polymorphisms each influence IL-12p70 secretion by dendritic cells in response to LPS. *Immunol Cell Biol* 84:227-232.

Pertwee RG, Griffin G, Lainton JA, Huffman JW (1995) Pharmacological characterization of three novel cannabinoid receptor agonists in the mouse isolated vas deferens. *Eur J Pharmacol* 284:241-247.

Pertwee RG (1997) Pharmacology of cannabinoid CB1 and CB2 receptors. *Pharmacol Ther* 74:129-180.

Pertwee RG (2002) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Pharmacol Ther* 95:165-174.

Pertwee RG (2007) Cannabinoids and multiple sclerosis. *Mol Neurobiol* 36:45-59.

Petersen BH, Graham J, Lemberger L (1976) Marihuana, tetrahydrocannabinol and T-cell function. *Life Sci* 19:395-400.

Petro TM (2005) Disparate expression of IL-12 by SJL/J and B10.S macrophages during Theiler's virus infection is associated with activity of TLR7 and mitogen-activated protein kinases. *Microbes Infect* 7:224-232.

Pflanz S, Timans JC, Cheung J, Rosales R, Kanzler H, Gilbert J, Hibbert L, Churakova T, Travis M, Vaisberg E, Blumenschein WM, Mattson JD, Wagner JL, To W, Zurawski S, McClanahan TK, Gorman DM, Bazan JF, de Waal-Malefyt R, Rennick D, Kastelein RA (2002) IL-27, a heterodimeric cytokine composed of EBI3 and p28 protein, induces proliferation of naive CD4(+) T cells. *Immunity* 16:779-790.

Piomelli D, Beltramo M, Giuffrida A, Stella N (1998) Endogenous cannabinoid signaling. *Neurobiol Dis* 5:462-473.

Piomelli D, Giuffrida A, Calignano A, Rodríguez de Fonseca F (2000) The endocannabinoid system as a target for therapeutic drugs. *Trends Pharmacol Sci* 21:218-224.

- Plevy SE, Gemberling JH, Hsu S, Dorner AJ, Smale ST (1997) Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol Cell Biol* 17:4572-4588.
- Pope JG, Karpus WJ, VanderLugt C, Miller SD (1996) Flow cytometric and functional analyses of central nervous system-infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease. Evidence for a CD4+ T cell-mediated pathology. *J Immunol* 156:4050-4058.
- Porter AC, Sauer JM, Knierman MD, Becker GW, Berna MJ, Bao J, Nomikos GG, Carter P, Bymaster FP, Leese AB, Felder CC (2002) Characterization of a novel endocannabinoid, virodhamine, with antagonist activity at the CB1 receptor. *J Pharmacol Exp Ther* 301:1020-1024.
- Pryce G, Ahmed Z, Hankey DJ, Jackson SJ, Croxford JL, Pocock JM, Ledent C, Petzold A, Thompson AJ, Giovannoni G, Cuzner ML, Baker D (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* 126:2191-2202.
- Pryce G, Baker D (2005) Emerging properties of cannabinoid medicines in management of multiple sclerosis. *Trends Neurosci* 28:272-276.
- Puffenberger RA, Boothe AC, Cabral GA (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* 29:58-69.
- Rajesh M, Mukhopadhyay P, Hasko G, Huffman JW, Mackie K, Pacher P (2008) CB(2) cannabinoid receptor agonists attenuate TNF-alpha-induced human vascular smooth muscle cell proliferation and migration. *Br J Pharmacol* 153:347-357.
- Ralevic V, Kendall DA, Jerman JC, Middlemiss DN, Smart D (2001) Cannabinoid activation of recombinant and endogenous vanilloid receptors. *Eur J Pharmacol* 424:211-219.
- Ramírez BG, Blázquez C, Gómez del Pulgar T, Guzman M, de Ceballos ML (2005) Prevention of Alzheimer's disease pathology by cannabinoids: neuroprotection mediated by blockade of microglial activation. *J Neurosci* 25:1904-1913.
- Ramos JA, Hernández ML, Cebeira M (2002) Los cannabinoides como medicamentos a lo largo de la historia: Actualización de los conocimientos del uso terapéutico de los cannabinoides. Ed. Agencia antidroga de la Comunidad de Madrid. p29-42.
- Ransohoff RM, Tani M (1998) Do chemokines mediate leukocyte recruitment in post-traumatic CNS inflammation? *Trends Neurosci* 21:154-159.
- Rapalino O, Lazarov-Spiegler O, Agranov E, Velan GJ, Yoles E, Fraidakis M, Solomon A, Gepstein R, Katz A, Belkin M, Hadani M, Schwartz M (1998) Implantation of stimulated homologous macrophages results in partial recovery of paraplegic rats. *Nat Med* 4:814-821.
- Renno T, Krakowski M, Piccirillo C, Lin JY, Owens T (1995) TNF-alpha expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154:944-953.
- Rivest S (2006) Cannabinoids in microglia: a new trick for immune surveillance and neuroprotection. *Neuron* 49:4-8.
- Robson P (2001) Therapeutic aspects of cannabis and cannabinoids. *Br J Psychiatry* 178:107-115.
- Rockwell CE, Kaminski NE (2004) A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J Pharmacol Exp Ther* 311:683-690.
- Rodriguez M, Nickerson C, Patick AK, David CS (1991) Expression of human HLA-B27 transgene alters susceptibility to murine Theiler's virus-induced demyelination. *J Immunol* 146:2596-2602.
- Röhn TA, Jennings GT, Hernández M, Grest P, Beck M, Zou Y, Kopf M, Bachmann MF (2006) Vaccination against IL-17 suppresses autoimmune arthritis and encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36:2857-2867.
- Rose JW, Hill KE, Watt HE, Carlson NG (2004) Inflammatory cell expression of cyclooxygenase-2 in the

multiple sclerosis lesion. *J Neuroimmunol* 149:40-49.

Ross RA, Craib SJ, Stevenson LA, Pertwee RG, Henderson A, Toole J, Ellington HC (2002) Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin E2 ethanolamide. *J Pharmacol Exp Ther* 301:900-907.

Russell WC (1997) *Viruses and MS: Molecular biology of Multiple Sclerosis*. Ed. Russell WC. John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, Reino Unido.

Sadovnick AD, Baird PA, Ward RH (1988) Multiple sclerosis: updated risks for relatives. *Am J Med Genet* 29:533-541.

Sagredo O, García-Arencibia M, de Lago E, Finetti S, Decio A, Fernández-Ruiz J (2007) Cannabinoids and neuroprotection in basal ganglia disorders. *Mol Neurobiol* 36:82-91.

Sánchez AJ, González-Pérez P, Galve-Roperh I, García-Merino A (2006) R-(+)-[2,3-Dihydro-5-methyl-3-(4-morpholinylmethyl)-pyrrolo-[1,2,3-de]-1,4 -benzoxazin-6-yl]-1-naphthalenylmethanone (WIN-2) ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis and induces encephalitogenic T cell apoptosis: partial involvement of the CB(2) receptor. *Biochem Pharmacol* 72:1697-1706.

Sánchez C, de Ceballos ML, del Pulgar TG, Rueda D, Corbacho C, Velasco G, Galve-Roperh I, Huffman JW, Cajal S, Guzman M (2001) Inhibition of glioma growth in vivo by selective activation of the CB(2) cannabinoid receptor. *Cancer Res* 61:5784-5789.

Sañudo-Peña MC, Tsou K, Walker JM (1999) Motor actions of cannabinoids in the basal ganglia output nuclei. *Life Sci* 65:703-713.

Sato S, Reiner SL, Jensen MA, Roos RP (1997) Central nervous system cytokine mRNA expression following Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J Neuroimmunol* 76:213-223.

Savettieri G, Elian M, Giordano D, Grimaldi G, Ventura A, Dean G (1986) A further study on the prevalence of multiple sclerosis in Sicily: Caltanissetta city. *Acta Neurol Scand* 73:71-75.

Schatz AR, Lee M, Condie RB, Pulaski JT, Kaminski NE (1997) Cannabinoid receptors CB1 and CB2: a characterization of expression and adenylate cyclase modulation within the immune system. *Toxicol Appl Pharmacol* 142:278-287.

Schmid HH, Berdyshev EV (2002) Cannabinoid receptor-inactive N-acylethanolamines and other fatty acid amides: metabolism and function. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:363-376.

Schmidt C, Giese T, Ludwig B, Mueller-Molaian I, Marth T, Zeuzem S, Meuer SC, Stallmach A (2005) Expression of interleukin-12-related cytokine transcripts in inflammatory bowel disease: elevated interleukin-23p19 and interleukin-27p28 in Crohn's disease but not in ulcerative colitis. *Inflamm Bowel Dis* 11:16-23.

Schwartz M (2003) Macrophages and microglia in central nervous system injury: are they helpful or harmful? *J Cereb Blood Flow Metab* 23:385-394.

Schwartz M, Kipnis J (2005) Protective autoimmunity and neuroprotection in inflammatory and noninflammatory neurodegenerative diseases. *J Neurol Sci* 233:163-166.

Schwartz M, Butovsky O, Bruck W, Hanisch UK (2006) Microglial phenotype: is the commitment reversible? *Trends Neurosci* 29:68-74.

Shaked I, Tchoresh D, Gersner R, Meiri G, Mordechai S, Xiao X, Hart RP, Schwartz M (2005) Protective autoimmunity: interferon-gamma enables microglia to remove glutamate without evoking inflammatory mediators. *J Neurochem* 92:997-1009.

Shnyra A, Brewington R, Alipio A, Amura C, Morrison DC (1998) Reprogramming of lipopolysaccharide-primed macrophages is controlled by a counterbalanced production of IL-10 and IL-12. *J Immunol* 160:3729-3736.

Sidney S, Beck JE, Tekawa IS, Quesenberry CP, Friedman GD (1997) Marijuana use and mortality. *Am J Public Health* 87:585-590.

- Sieling PA, Abrams JS, Yamamura M, Salgame P, Bloom BR, Rea TH, Modlin RL (1993) Immunosuppressive roles for IL-10 and IL-4 in human infection. In vitro modulation of T cell responses in leprosy. *J Immunol* 150:5501-5510.
- Snow BJ, Tsui JK, Bhatt MH, Varelas M, Hashimoto SA, Calne DB (1990) Treatment of spasticity with botulinum toxin: a double-blind study. *Ann Neurol* 28:512-515.
- Sonderegger I, Rohn TA, Kurrer MO, Iezzi G, Zou Y, Kastelein RA, Bachmann MF, Kopf M (2006) Neutralization of IL-17 by active vaccination inhibits IL-23-dependent autoimmune myocarditis. *Eur J Immunol* 36:2849-2856.
- Sonobe Y, Yawata I, Kawanokuchi J, Takeuchi H, Mizuno T, Suzumura A (2005) Production of IL-27 and other IL-12 family cytokines by microglia and their subpopulations. *Brain Res* 1040:202-207.
- Sorensen PS, Fazekas F, Lee M (2002) Intravenous immunoglobulin G for the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: a meta-analysis. *Eur J Neurol* 9:557-563.
- Soria-Gómez E, Matias I, Rueda-Orozco PE, Cisneros M, Petrosino S, Navarro L, Di Marzo V, Próspero-García O (2007) Pharmacological enhancement of the endocannabinoid system in the nucleus accumbens shell stimulates food intake and increases c-Fos expression in the hypothalamus. *Br J Pharmacol* 151:1109-1116.
- Stangel M, Compston A, Scolding NJ (2000) Oligodendroglia are protected from antibody-mediated complement injury by normal immunoglobulins ("IVIg"). *J Neuroimmunol* 103:195-201.
- Stangel M, Compston A (2001) Polyclonal immunoglobulins (IVIg) modulate nitric oxide production and microglial functions in vitro via Fc receptors. *J Neuroimmunol* 112:63-71.
- Stefano GB, Liu Y, Goligorsky MS (1996) Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide release in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J Biol Chem* 271:19238-19242.
- Stella N, Piomelli D (2001) Receptor-dependent formation of endogenous cannabinoids in cortical neurons. *Eur J Pharmacol* 425:189-196.
- Stence N, Waite M, Dailey ME (2001) Dynamics of microglial activation: a confocal time-lapse analysis in hippocampal slices. *Glia* 33:256-266.
- Stern AS, Podlaski FJ, Hulmes JD, Pan YC, Quinn PM, Wolitzky AG, Familletti PC, Stremlo DL, Truitt T, Chizzonite R, Gately MK (1990) Purification to homogeneity and partial characterization of cytotoxic lymphocyte maturation factor from human B-lymphoblastoid cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:6808-6812.
- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Prog Neurobiol* 58:233-247.
- Strasser-Fuchs S, Fazekas F, Deisenhammer F, Nahler G, Mamoli B (2000) The Austrian Immunoglobulin in MS (AIMS) study: final analysis. *Mult Scler* 6 Suppl 2:S9-13.
- Sugiura T, Kondo S, Sukagawa A, Nakane S, Shinoda A, Itoh K, Yamashita A, Waku K (1995) 2-Arachidonoylglycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem Biophys Res Commun* 215:89-97.
- Sugiura T, Waku K (2000) 2-Arachidonoylglycerol and the cannabinoid receptors. *Chem Phys Lipids* 108:89-106.
- Sugiura T, Kobayashi Y, Oka S, Waku K (2002) Biosynthesis and degradation of anandamide and 2-arachidonoylglycerol and their possible physiological significance. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* 66:173-192.
- Sullivan JM (2000) Cellular and molecular mechanisms underlying learning and memory impairments produced by cannabinoids. *Learn Mem* 7:132-139.
- Tang JL, Lancz G, Specter S, Bullock H (1992) Marijuana and immunity: tetrahydrocannabinol-mediated inhibition of growth and phagocytic activity of the murine macrophage cell line, P388D1. *Int J Immunopharmacol* 14:253-262.

- Taoufik Y, de Goer de Herve MG, Giron-Michel J, Durali D, Cazes E, Tardieu M, Azzarone B, Delfraissy JF (2001) Human microglial cells express a functional IL-12 receptor and produce IL-12 following IL-12 stimulation. *Eur J Immunol* 31:3228-3239.
- Tarrant TK, Silver PB, Chan CC, Wiggert B, Caspi RR (1998) Endogenous IL-12 is required for induction and expression of experimental autoimmune uveitis. *J Immunol* 161:122-127.
- Tashkin DP, Baldwin GC, Sarafian T, Dubinett S, Roth MD (2002) Respiratory and immunologic consequences of marijuana smoking. *J Clin Pharmacol* 42:715-815.
- Tham CS, Whitaker J, Luo L, Webb M (2007) Inhibition of microglial fatty acid amide hydrolase modulates LPS stimulated release of inflammatory mediators. *FEBS Lett* 581:2899-2904.
- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH, McDonald WI, Brochet B, Filippi M, Montalbán X, De Sa J (1997) Primary progressive multiple sclerosis. *Brain* 120 (Pt 6):1085-1096.
- Thompson AJ, Montalbán X, Barkhof F, Brochet B, Filippi M, Miller DH, Polman CH, Stevenson VL, McDonald WI (2000) Diagnostic criteria for primary progressive multiple sclerosis: a position paper. *Ann Neurol* 47:831-835.
- Tichauer J, Saud K, von Bernhardt R (2007) Modulation by astrocytes of microglial cell-mediated neuroinflammation: effect on the activation of microglial signaling pathways. *Neuroimmunomodulation* 14:168-174.
- Tomida I, Pertwee RG, Azuara-Blanco A (2004) Cannabinoids and glaucoma. *Br J Ophthalmol* 88:708-713.
- Touw M (1981) The religious and medicinal uses of Cannabis in China, India and Tibet. *J Psychoactive Drugs* 13:23-34.
- Trapani JA, Davis J, Sutton VR, Smyth MJ (2000) Proapoptotic functions of cytotoxic lymphocyte granule constituents in vitro and in vivo. *Curr Opin Immunol* 12:323-329.
- Traugott U, Lebon P (1988) Demonstration of alpha, beta, and gamma interferon in active chronic multiple sclerosis lesions. *Ann N Y Acad Sci* 540:309-311.
- Trembleau S, Penna G, Gregori S, Giarratana N, Adorini L (2003) IL-12 administration accelerates autoimmune diabetes in both wild-type and IFN-gamma-deficient nonobese diabetic mice, revealing pathogenic and protective effects of IL-12-induced IFN-gamma. *J Immunol* 170:5491-5501.
- Tremlett HL, Luscombe DK, Wiles CM (1998) Use of corticosteroids in multiple sclerosis by consultant neurologists in the United Kingdom. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 65:362-365.
- Trinchieri G (1998) Immunobiology of interleukin-12. *Immunol Res* 17:269-278.
- Trinchieri G, Pflanz S, Kastelein RA (2003) The IL-12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. *Immunity* 19:641-644.
- Tsou K, Brown S, Sañudo-Peña MC, Mackie K, Walker JM (1998) Immunohistochemical distribution of cannabinoid CB1 receptors in the rat central nervous system. *Neuroscience* 83:393-411.
- Tsunoda I, Fujinami RS (2002) Inside-Out versus Outside-In models for virus induced demyelination: axonal damage triggering demyelination. *Springer Semin Immunopathol* 24:105-125.
- Turkanis SA, Partlow LM, Karler R (1991) Delta-9-tetrahydrocannabinol depresses inward sodium current in mouse neuroblastoma cells. *Neuropharmacology* 30:73-77.
- Twitchell W, Brown S, Mackie K (1997) Cannabinoids inhibit N- and P/Q-type calcium channels in cultured rat hippocampal neurons. *J Neurophysiol* 78:43-50.
- Ueda N, Yamanaka K, Yamamoto S (2001) Purification and characterization of an acid amidase selective for N-palmitoylethanolamine, a putative endogenous anti-inflammatory substance. *J Biol Chem* 276:35552-35557.
- Ullrich O, Merker K, Timm J, Tauber S (2007) Immune control by endocannabinoids - new mechanisms of neuroprotection? *J Neuroimmunol* 184:127-135.



- Utsugi M, Dobashi K, Ishizuka T, Endou K, Hamuro J, Murata Y, Nakazawa T, Mori M (2003) c-Jun N-terminal kinase negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J Immunol* 171:628-635.
- Uyttenhove C, Van Snick J (2006) Development of an anti-IL-17A auto-vaccine that prevents experimental auto-immune encephalomyelitis. *Eur J Immunol* 36:2868-2874.
- Vaknin-Dembinsky A, Balashov K, Weiner HL (2006) IL-23 is increased in dendritic cells in multiple sclerosis and down-regulation of IL-23 by antisense oligos increases dendritic cell IL-10 production. *J Immunol* 176:7768-7774.
- Van der Kloot W (1994) Anandamide, a naturally-occurring agonist of the cannabinoid receptor, blocks adenylyl cyclase at the frog neuromuscular junction. *Brain Res* 649:181-184.
- Van Sickle MD, Oland LD, Ho W, Hillard CJ, Mackie K, Davison JS, Sharkey KA (2001) Cannabinoids inhibit emesis through CB1 receptors in the brainstem of the ferret. *Gastroenterology* 121:767-774.
- Van Sickle MD, Duncan M, Kingsley PJ, Mouihate A, Urbani P, Mackie K, Stella N, Makriyannis A, Piomelli D, Davison JS, Marnett LJ, Di Marzo V, Pittman QJ, Patel KD, Sharkey KA (2005) Identification and functional characterization of brainstem cannabinoid CB2 receptors. *Science* 310:329-332.
- Vaughan DW, Peters A (1974) Neuroglial cells in the cerebral cortex of rats from young adulthood to old age: an electron microscope study. *J Neurocytol* 3:405-429.
- Waetzig V, Czeloth K, Hidding U, Mielke K, Kanzow M, Brecht S, Goetz M, Lucius R, Herdegen T, Hanisch UK (2005) c-Jun N-terminal kinases (JNKs) mediate pro-inflammatory actions of microglia. *Glia* 50:235-246.
- Wagner JA, Varga K, Ellis EF, Rzigalinski BA, Martin BR, Kunos G (1997) Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* 390:518-521.
- Waksman Y, Olson JM, Carlisle SJ, Cabral GA (1999) The central cannabinoid receptor (CB1) mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J Pharmacol Exp Ther* 288:1357-1366.
- Walker PR, Calzascia T, Schnuriger V, Scamuffa N, Saas P, de Tribolet N, Dietrich PY (2000) The brain parenchyma is permissive for full antitumor CTL effector function, even in the absence of CD4 T cells. *J Immunol* 165:3128-3135.
- Walter L, Franklin A, Witting A, Wade C, Xie Y, Kunos G, Mackie K, Stella N (2003) Nonpsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J Neurosci* 23:1398-1405.
- Walter L, Stella N (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br J Pharmacol* 141:775-785.
- Wang H, Xie H, Dey SK (2006) Endocannabinoid signaling directs periimplantation events. *AAPS J* 8:E425-E432.
- Ware MA, Gamsa A, Persson J, Fitzcharles MA (2002) Cannabis for chronic pain: case series and implications for clinicians. *Pain Res Manag* 7:95-99.
- Wartmann M, Campbell D, Subramanian A, Burstein SH, Davis RJ (1995) The MAP kinase signal transduction pathway is activated by the endogenous cannabinoid anandamide. *FEBS Lett* 359:133-136.
- Wei R, Jonakait GM (1999) Neurotrophins and the anti-inflammatory agents interleukin-4 (IL-4), IL-10, IL-11 and transforming growth factor-beta1 (TGF-beta1) down-regulate T cell costimulatory molecules B7 and CD40 on cultured rat microglia. *J Neuroimmunol* 95:8-18.
- Weinshenker BG, Bass B, Rice GP, Noseworthy J, Carriere W, Baskerville J, Ebers GC (1989) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. I. Clinical course and disability. *Brain* 112 (Pt 1):133-146.
- Weinstein JR, Swarts S, Bishop C, Hanisch UK, Moller T (2008) Lipopolysaccharide is a frequent and significant contaminant in microglia-activating factors. *Glia* 56:16-26.
- Weinstock-Guttman B, Jacobs LD (2000) What is new in the treatment of multiple sclerosis? *Drugs* 59:401-410.

- Welch SP, Thomas C, Patrick GS (1995) Modulation of cannabinoid-induced antinociception after intracerebroventricular versus intrathecal administration to mice: possible mechanisms for interaction with morphine. *J Pharmacol Exp Ther* 272:310-321.
- White SC, Brin SC, Janicki BW (1975) Mitogen-induced blastogenic responses of lymphocytes from marijuana smokers. *Science* 188:71-72.
- Wiekowski MT, Leach MW, Evans EW, Sullivan L, Chen SC, Vassileva G, Bazan JF, Gorman DM, Kastelein RA, Narula S, Lira SA (2001) Ubiquitous transgenic expression of the IL-23 subunit p19 induces multiorgan inflammation, runting, infertility, and premature death. *J Immunol* 166:7563-7570.
- Williams CM, Kirkham TC (2002) Observational analysis of feeding induced by Delta9-THC and anandamide. *Physiol Behav* 76:241-250.
- Witting A, Walter L, Wacker J, Moller T, Stella N (2004) P2X7 receptors control 2-arachidonoylglycerol production by microglial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:3214-3219.
- Witting A, Chen L, Cudaback E, Straiker A, Walter L, Rickman B, Moller T, Brosnan C, Stella N (2006) Experimental autoimmune encephalomyelitis disrupts endocannabinoid-mediated neuroprotection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103:6362-6367.
- Wolf SF, Temple PA, Kobayashi M, Young D, Dicig M, Lowe L, Dzialo R, Fitz L, Ferenz C, Hewick RM (1991) Cloning of cDNA for natural killer cell stimulatory factor, a heterodimeric cytokine with multiple biologic effects on T and natural killer cells. *J Immunol* 146:3074-3081.
- Woodward DF, Krauss AH, Chen J, Lai RK, Spada CS, Burk RM, Andrews S W, Shi L, Liang Y, Kedzie KM, Chen R, Gil DW, Kharlamb A, Archeampong A, Ling J, Madhu C, Ni J, Rix P, Usansky J, Usansky H, Weber A, Welty D, Yang W, Tang-Liu DD, Garst ME, Brar B, Wheeler LA, Kaplan LJ (2001) The pharmacology of bimatoprost (Lumigan). *Surv Ophthalmol* 45 Suppl 4:S337-S345.
- Wu G, Luo J, Rana JS, Laham R, Sellke FW, Li J (2006) Involvement of COX-2 in VEGF-induced angiogenesis via P38 and JNK pathways in vascular endothelial cells. *Cardiovasc Res* 69:512-519.
- Wucherpfennig KW, Weiner HL, Hafler DA (1991) T-cell recognition of myelin basic protein. *Immunol Today* 12:277-282.
- Wyss-Coray T, Mucke L (2002) Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword. *Neuron* 35:419-432.
- Yanagawa Y, Iijima N, Iwabuchi K, Onoe K (2002) Activation of extracellular signal-related kinase by TNF-alpha controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J Leukoc Biol* 71:125-132.
- Yang CS, Song CH, Lee JS, Jung SB, Oh JH, Park J, Kim HJ, Park JK, Paik TH, Jo EK (2006) Intracellular network of phosphatidylinositol 3-kinase, mammalian target of the rapamycin/70 kDa ribosomal S6 kinase 1, and mitogen-activated protein kinases pathways for regulating mycobacteria-induced IL-23 expression in human macrophages. *Cell Microbiol* 8:1158-1171.
- Yu M, Ives D, Ramesha CS (1997) Synthesis of prostaglandin E2 ethanolamide from anandamide by cyclooxygenase-2. *J Biol Chem* 272:21181-21186.
- Yuan M, Kiertscher SM, Cheng Q, Zoumalan R, Tashkin DP, Roth MD (2002) Delta 9-Tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J Neuroimmunol* 133:124-131.
- Zajicek J, Fox P, Sanders H, Wright D, Vickery J, Nunn A, Thompson A (2003) Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMS study): multicentre randomised placebo-controlled trial. *Lancet* 362:1517-1526.
- Zhang J, Hoffert C, Vu HK, Groblewski T, Ahmad S, O'Donnell D (2003) Induction of CB2 receptor expression in the rat spinal cord of neuropathic but not inflammatory chronic pain models. *Eur J Neurosci* 17:2750-2754.
- Zhu W, Igarashi T, Friedman H, Klein TW (1995) delta 9-Tetrahydrocannabinol (THC) causes the variable expression of IL2 receptor subunits. *J Pharmacol Exp Ther* 274:1001-1007.

Zias J, Stark H, Sellgman J, Levy R, Werker E, Breuer A, Mechoulam R (1993) Early medical use of cannabis. *Nature* 363:215.

Zivadinov R, Rudick RA, De Masi R, Nasuelli D, Ukmar M, Pozzi-Mucelli RS, Grop A, Cazzato G, Zorzon M (2001) Effects of IV methylprednisolone on brain atrophy in relapsing-remitting MS. *Neurology* 57:1239-1247.

Zygmunt PM, Petersson J, Andersson DA, Chuang H, Sorgard M, Di Marzo V, Julius D, Hogestatt ED (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* 400:452-457.



**Publicaciones**



# Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis

Leyre Mestre,<sup>\*,1</sup> Fernando Correa,<sup>\*,1</sup> Angel Arévalo-Martín,<sup>\*,2</sup> Eduardo Molina-Holgado,<sup>\*,2</sup> Marta Valenti,<sup>†</sup> Giorgio Ortari,<sup>‡,‡</sup> Vincenzo Di Marzo<sup>†</sup> and Carmen Guaza<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC, Madrid, Spain

<sup>†</sup>Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Pozzuoli (NA), Italy

<sup>‡</sup>Dipartimento di Studi Farmaceutici, Università 'La Sapienza', Roma, Italy

## Abstract

Theiler's virus infection of the central nervous system (CNS) induces an immune-mediated demyelinating disease in susceptible mouse strains and serves as a relevant infection model for human multiple sclerosis (MS). Cannabinoids have been shown to exert beneficial effects on animal models of MS and evidence suggests that the endocannabinoid system plays a role in the tonic control of spasticity. In this study we show that OMDM1 [(*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine] and OMDM2 [(*S*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine], two selective inhibitors of the putative endocannabinoid transporter and hence of endocannabinoid inactivation, provide an effective therapy for Theiler murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD). Treatment of TMEV-infected mice with OMDM1

and OMDM2 enhanced anandamide levels in the spinal cord and ameliorated motor symptoms. This was associated with a down-regulation of inflammatory responses in the spinal cord. In addition we show that OMDM1 and OMDM2 down-regulate macrophage function by (i) decreasing the surface expression of major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, (ii) inhibiting nitric oxide synthase-2 (NOS-2) expression and (iii) reducing the production of the pro-inflammatory cytokines interleukin-1 $\beta$  and interleukin-12 (IL-12p40). Taken together, these results point to the manipulation of the endocannabinoid system as a possible strategy to develop future MS therapeutic drugs.

**Keywords:** endocannabinoid inactivation, experimental multiple sclerosis, macrophages.

*J. Neurochem.* (2005) **92**, 1327–1339.

Macrophages/microglia are activated early in response to infection or injury and are major players in both innate and immune-mediated central nervous system (CNS) inflammatory responses, by performing both scavenger and antigen presenting cell functions. Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated inflammatory disease in humans that is

characterized by peripheral T-cell responses to myelin proteins and demyelinating lesions in the brain and spinal cord associated with the presence of both CD4 T cells and activated microglia/macrophages (Noseworthy *et al.* 2000). Epidemiological evidence suggests that virus infection may trigger the development of MS (Johnson 1994). Theiler's

Received May 12, 2004; revised manuscript received October 29, 2004; accepted November 1, 2004.

Address correspondence and reprint requests to either of these authors: Carmen Guaza, Cajal Institute, Avda Dr Arce 37, 28002 Madrid, Spain. E-mail: cgjb@cajal.csic.es

Vincenzo Di Marzo, Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Campi Flegrei 34, 80078 Pozzuoli (NA), Italy. E-mail: vdimarzo@icmb.na.cnr.it

<sup>1</sup>L. Mestre and F. Correa contributed equally to this work.

<sup>2</sup>The present address of E. Molina-Holgado and A. Arévalo-Martín is Neuroinflammation Group, Unidad de Investigación, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain.

**Abbreviations used:** AEA, anandamide; 2-AG, 2-arachidonoyl glycerol; CB, cannabinoid; CB1, cannabinoid receptor 1; CB2, cannabinoid receptor 2; CNS, central nervous system; CREAE, chronic relapsing remitting experimental allergic encephalomyelitis; DA, Daniel's strain; FACS, fluorescence-activated cell sorting; IFN- $\gamma$ , interferon- $\gamma$ ; IL-1 $\beta$ , interleukin-1 $\beta$ ; IL-12, interleukin-12; IL-12p40, interleukin-12 subunit p40; LPS, lipopolysaccharide; MHC, major histocompatibility complex; MOI, multiplicity of infection; MS, multiple sclerosis; NO, nitric oxide; NOS-2, nitric oxide synthase-2; OMDM1, (*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine; OMDM2, (*S*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine; SR1, antagonist CB1 receptors; SR2, antagonist CB2 receptors; TMEV, Theiler's murine encephalomyelitis virus; TMEV-IDD, TMEV-induced demyelinating disease.

murine encephalomyelitis virus (TMEV) is a common enteric mouse picornavirus, but when injected into the CNS of susceptible strains of mice induces a demyelinating disease that serves as a highly relevant virus-induced model for human MS. Infection of SJL/J mice with TMEV results in a life-long persistent infection of macrophages, microglia, and astrocytes (Pena-Rossi *et al.* 1997; Zheng *et al.* 2001). A chronic progressive demyelinating disease is observed with the onset of symptoms around 30–60 post-infection days. Initial myelin damage is mediated by a bystander mechanism, wherein the primary effector cells are mononuclear phagocytes (microglia-macrophages) activated by inflammatory cytokines produced from TMEV-specific Th1 cells responding to viral epitopes that persist in the CNS. In the chronic phases of the disease, epitope spreading leads to T cell responses to myelin autoepitopes (Miller *et al.* 1997). Mice exhibit progressive impaired motor coordination, incontinence and paralysis associated with axonal loss and spinal cord atrophy (McGavern *et al.* 2000).

Cannabinoids, the bioactive components of *Cannabis sativa*, as well as synthetic cannabinoid-related compounds, owe the majority of their activities to activation of the known cannabinoid receptors, CB1 and CB2 (Matsuda *et al.* 1990; Howlett *et al.* 2002) as well as of possible yet to be identified cannabinoid-like receptors (Di Marzo *et al.* 2000; Breivogel *et al.* 2001). Furthermore, fatty acid-derived endogenous ligands of cannabinoid receptors, the endocannabinoids anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) (Devane *et al.* 1992; Mechoulam *et al.* 1995), and a degradation system including a re-uptake mechanism and hydrolytic enzymes for these compounds, have been identified (Di Marzo *et al.* 1998). Cannabinoids have been reported to alleviate spasticity and tremor in mice with chronic relapsing experimental allergic encephalitis (CREAE) (Baker *et al.* 2000), in agreement with their inhibitory effects on pain and motor behaviour. Of interest is that spastic mice showed increased levels of endocannabinoids in brain and spinal cord, suggesting a tonic control of spasticity by the endocannabinoid system, at least in the case of CREAE mice (Baker *et al.* 2001).

Most of the current therapeutic treatments for MS involve strategies related to immune modulation (Compston and Coles 2002). In this line, several recent reports described beneficial effects of cannabinoids, based on their anti-inflammatory and immunomodulatory properties, on viral models of MS such as TMEV encephalomyelitis. Thus, amelioration of clinical scores by treatment with a cannabinoid receptor agonist WIN 55212 was associated with decreased viral and myelin specific Th1 effector functions (Croxford and Miller 2003). Besides, our group showed recovery of motor function and enhancement of remyelination in the spinal cord of TMEV-infected mice, possibly through the attenuation of inflammation and/or promoting the survival of oligodendroglial progenitors following the

treatment with CB1 and CB2 cannabinoid receptor agonists (Molina-Holgado *et al.* 2002; Arévalo-Martín *et al.* 2003). Because results from the first large-scale randomized trial to assess the potential benefit of cannabis in the treatment of MS suggested some improvement in patients' mobility and pain perception (Zajicek *et al.* 2003), it is necessary to gain further insights into new therapeutic targets related to the pharmacological manipulation of the endocannabinoid network. The present study investigated the potential protective effects in the TMEV-induced demyelinating disease (TMEV-IDD) model of MS of selective inhibitors of endocannabinoid cellular uptake (Ortar *et al.* 2003), which by preventing the degradation of endocannabinoids enhance their half-life *in vivo*. The effects of these inhibitors on the expression of activation markers of macrophages, was also investigated.

## Materials and methods

### Animals and Theiler's virus inoculation

We used female SJL/J mice, susceptible to TMEV-IDD development, from our in-house colony (Cajal Institute, Madrid), maintained on food and water *ad libitum* in a 12-h dark–light cycle. Four-week-old mice were inoculated intracerebrally in the right cerebral hemisphere with  $10^6$  plaque forming units (PFU) of Daniel's (DA) TMEV strain in 30  $\mu$ L of Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% of fetal calf serum as previously described (Arévalo-Martín *et al.* 2003). Handling of animals was performed in compliance with the guidelines of animal care set by the European Union (86/609/EEC).

### Evaluation of motor function

To evaluate neurological deficits of mice, we used the rotarod test, which measures balance, coordination and motor control. The rotarod apparatus (Ugo Basile, Milan, Italy) consists of a suspended rod able to run at constant or at accelerating speed. All mice were exposed to a training period at constant speed to familiarize them with the apparatus prior to treatments and at accelerating speed while the test was being performed. Data were collected from mouse rotarod performance 1 day before the beginning of treatment, and 1 day after the end of the treatment. The trial was terminated when mice fell from the apparatus or after a maximum of 5 min. The screening for locomotor activity was performed using an activity cage (Activity Monitor System Omnitech Electronics, Inc., Columbus, OH, USA) coupled to a Digiscan Analyser. Data for the following variables of locomotor activity for a session of 10 min were collected every 5 min (1–5 min: 1; 5–10 min: 2): (i) horizontal activity, as the duration time (s) travelled by the animal, and (ii) vertical activity, as the total number of beam interruptions in the vertical sensor. Data were analysed using analysis of variance (ANOVA) and by a *post hoc* Tukey multiple comparison test, when appropriate. For multiple data obtained by the repeated measurement from one subject, we used ANOVA for repeated measures.

### Experimental procedure

At 60 days after TMEV infection, motor dysfunction was tested by both, the rotarod assay and the activity cage. Sham-mice (control,



$n = 40$ ) and TMEV-infected mice ( $n = 40$ ) were assigned to five groups ( $n = 8$ ), with initially no significant differences between them in their ability to perform the rotarod test. Mice from these groups were injected intraperitoneally once a day for 10 days with OMDM1 [(*R*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine] or OMDM2 [(*S*)-*N*-oleoyl-(1'-hydroxybenzyl)-2'-ethanolamine] (2 mg/kg or 7 mg/kg) or vehicle (5% bovine serum albumin and 0.2% dimethylsulfoxide in phosphate-buffered saline). Doses were calculated based on their cannabinoid receptor binding affinities (Ortaz *et al.* 2003) and on their activity *in vivo* in rodents (de Lago *et al.* 2004). We also evaluated locomotor activity in control or TMEV-infected mice subjected to the same treatment with OMDM1 and OMDM2, or the appropriate vehicle using the activity cage for a 10-min session. To evaluate the effects of OMDM1 and OMDM2, motor behavioural tests were performed 1 day after the corresponding treatments. Sham OMDM1 and OMDM2-treated mice displayed similar locomotor responses than vehicle treated mice.

### Tissue processing and immunohistochemistry

Mice were anaesthetized by intraperitoneal pentobarbital administration (50 mg/kg body weight) and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer. Spinal cords were collected, the tissue was post-fixed in 4% paraformaldehyde in 0.1 mol/L phosphate buffer, cryoprotected with a 30% solution of sucrose in 0.1 mol/L phosphate buffer and frozen in dry ice. We then obtained 35  $\mu\text{m}$ -thick coronal cryostat sections and processed them to visualize microglia/macrophages using Mac-1 anti-CD11b antibody (Serotec Ltd, Oxford, UK). Immunostaining was visualized with Alexa-conjugated secondary anti-mouse (Molecular Probes, Eugene, Oregon, USA). Specificity of staining was confirmed by omitting the primary antibody. Five randomly selected spinal cord images per mouse at different levels were obtained by confocal microscopy, with constant laser beam intensity and photodetector sensitivity. Images were analysed with NIH Image software fixed to detect Mac-1<sup>+</sup> cells larger than 25  $\mu\text{m}^2$ , a size we consider as reactive microglia. To confirm that this was a correct size threshold, we analysed spinal cords from sham mice (control animals), and the software detected no activated cells in spinal cord. For routine histological examination, adjacent spinal cord sections were stained with Tomato lectin (biotinylated lectin from *Lycopersicon esculentum*, Tomato, L-9389, Sigma, Madrid, Spain) for the visualization of microglial cells. Briefly, after endogenous peroxidase blocking with 2% hydrogen peroxide in 100% methanol, sections were incubated with the biotinylated lectin. After incubation, sections were washed in Tris-buffered saline and incubated with avidin-peroxidase (A-3151, Sigma) followed by counterstaining with toluidine blue. The peroxidase reaction product was visualized using 3,3'-diaminobenzidine method.

### Macrophage cultures

Peritoneal exudate macrophages were harvested by peritoneal lavage of SJL/J female mice with ice-cold sterile Hank's balanced salt solution (Sigma) 3 days after intraperitoneal injection of mice with 2 mL of 5% thioglycollate broth (Sigma). Cells were centrifuged at low speed 10 min at room temperature (22–24°C) and resuspended in Gey's red cells lysis buffer. After 20 min of incubation at room temperature, cells were centrifuged and resuspended in fresh Dulbecco's modified Eagle's medium supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (Gibco BRL; Life Tec. Ltd Ger),

100 U/mL penicillin and 100  $\mu\text{g/mL}$  streptomycin (Gibco BRL, Life Technologies Ltd, Karlsruhe, Germany). Cells were seeded in 12-well plates ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) and incubated overnight at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. One hour prior to stimulation, non-adherent cells were removed by washing twice with Dulbecco's modified Eagle's medium and macrophages were resuspended in fresh culture medium supplemented with antibiotics and 5% fetal bovine serum. Five minutes previous to lipopolysaccharide (LPS; *Escherichia coli*, Serotype 026:B6, Sigma) and interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ; PeproTech, London, UK) stimulation, macrophages were exposed to 1, 5, 10 or 15  $\mu\text{M}$  AEA (Sigma) and/or cannabinoid-related compounds added at final concentrations of 5 and 10  $\mu\text{M}$  in the case of OMDM1 and OMDM2. CB1 and CB2 receptor antagonists, SR141716A [*N*-piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-3-pyrazole-carboxamide] and SR144528 [(*N*-[1*S*]-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl)-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide], respectively, were gifts from Sanofi (Montpellier, France), and added at doses of 1  $\mu\text{M}$ . LPS and IFN- $\gamma$  were diluted in Dulbecco's modified Eagle's medium and, based in our previous experiments (Molina-Holgado *et al.* 2001), added to each well at a final concentration of 50 ng/mL and 100 U/mL, respectively. Stimulated cells were incubated for 18 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After this time, cells were harvested for protein measurement and supernatants were collected for cytokine determination. Trypan dye exclusion testing or the 3,4,5-dimethylthiazol-2,5-diphenyltetrazolium bromide thiazol blue test indicated that the cannabinoid-related compounds did not affect cell viability.

### Infection of macrophage cultures

Macrophage cultures from SJL/J mice were infected with the DA strain of TMEV at a multiplicity of infection (MOI) of 5 PFU per cell. Cell cultures were washed twice to remove serum components and 0.25 mL of appropriately diluted virus stock solution was added to each well. After adsorption of the virus for 2 h at 37°C cells, we added 0.75 mL of new medium containing only 2% fetal bovine serum. The supernatants from TMEV-infected and non-infected cultures were collected in parallel for cytokine determination at 24 h post-infection. Infected macrophages did not exhibit significant cytopathic effects 24 h after infection.

### Western blot analysis

To determine nitric oxide synthase-2 (NOS-2) expression, macrophages were washed with ice-cold phosphate-buffered saline and lysed in 200  $\mu\text{L}$  of Tris-buffered saline pH 7.6 containing 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulphonyl fluoride, 50  $\mu\text{g/mL}$  leupeptin, 10  $\mu\text{g/mL}$  aprotinin, 5 mM benzamidine, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM NaF and 5 mM dithiothreitol. Whole-cell extracts were mixed with 5  $\times$  Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Equal amounts of protein (30  $\mu\text{g}$ ) were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted for 1 h at 4°C to nitrocellulose (Amersham Biosciences). The membrane blots were blocked for 1 h at room temperature in 5% (w/v) dry skim milk (Sveltesse, Nestlé, Barcelona, Spain) in Tris-buffered saline containing 0.1% Tween-20 and then incubated with primary antibodies anti-NOS-2 (Signal Transduction, Calbiochem La Jolla, CA; dilution 1 : 2000) for 1.5 h. After extensive washing in 5%

milk-Tris-buffered saline plus Tween solution, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (Jackson Immuno-Research Laboratories, West Grove, PA, USA) and visualized by chemiluminescence using an enhanced chemiluminescence western Blotting Detection Kit (Amersham Biosciences Europe, Barcelona, Spain). The signals were quantified by densitometry. To normalize for equal loading and protein transfer, the membranes were stripped in 62.5 mM Tris-HCl buffer pH 6.8 containing 2% sodium dodecyl sulfate and 0.7%  $\beta$ -mercaptoethanol and were reprobed by incubating with an antibody for  $\alpha$ -tubulin (1 : 40000, Sigma).

#### Immunocytochemistry in cultured cells

Immunostaining was done directly on cells seeded on glass coverslips. Macrophages plated onto poly D-lysine-coated (5  $\mu$ g/mL) coverslips were fixed in 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline for 20 min at room temperature. Coverslips were then rinsed in phosphate-buffered saline and incubated for 2 h at room temperature with the Mac-1 anti-CD11b antibody at a dilution 1 : 500 (Serotec) or anti I-A class II antibody (1 : 1000, clone OX-6, Serotec). Immunostaining was visualized with Alexa-conjugated secondary (1 : 1000) anti-mouse IgG-Alexa 488 and anti-rat IgG Alexa antibodies (Molecular Probes). Non-specific interactions of secondary antibodies were confirmed by omitting primary antibodies. At least three independent cultures were examined.

#### Flow cytometric analysis

Cells ( $10^6$ /mL) were scraped and, after centrifugation, resuspended and incubated in flow cytometric analysis (FACS) blocking buffer (phosphate-buffered saline, 0.1% sodium azide, 5% fetal calf serum) at 4°C for 30 min. After three washes with FACS staining buffer (phosphate-buffered saline, 0.1% sodium azide, 2% fetal calf serum), the cells were resuspended and incubated with anti-mouse major histocompatibility complex class II (MHC II) (I-Ak):FITC (Clon 14 V18, Serotec) at 4°C for 30 min in the dark. After three washes with FACS buffer staining, cells were incubated with IgG:FITC (isotype control) at 4°C for 30 min in the dark. Cells were washed twice with FACS staining buffer, resuspended in cold buffer and fixed with 1% paraformaldehyde. Samples were run on an EPICS XL FACSscan instrument (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA).

#### Cytokine enzyme-linked immunosorbent assay

IL-1 $\beta$  content in macrophage culture supernatants was measured by solid phase sandwich ELISA, using a monoclonal antibody specific for murine IL-1 $\beta$  (Biosource Int., Camarillo, CA, USA). The minimum detectable dose of mouse IL-1 $\beta$  was less than 7 pg/mL and the intra and inter coefficient of variation were  $4.4 \pm 0.5$  and  $8.9 \pm 0.9$ , respectively. Levels of IL-12 subunit p40 (IL-12p40) in macrophage supernatants were quantified using specific ELISA kits purchased from Biosource Int., according to the manufacturer's instructions. The assay detected >2 pg/mL and the intra and inter assay coefficients of variations were 3.3–4.5% and 5.6–6.4%, respectively.

#### Effect of endocannabinoid uptake inhibitors on endocannabinoid levels

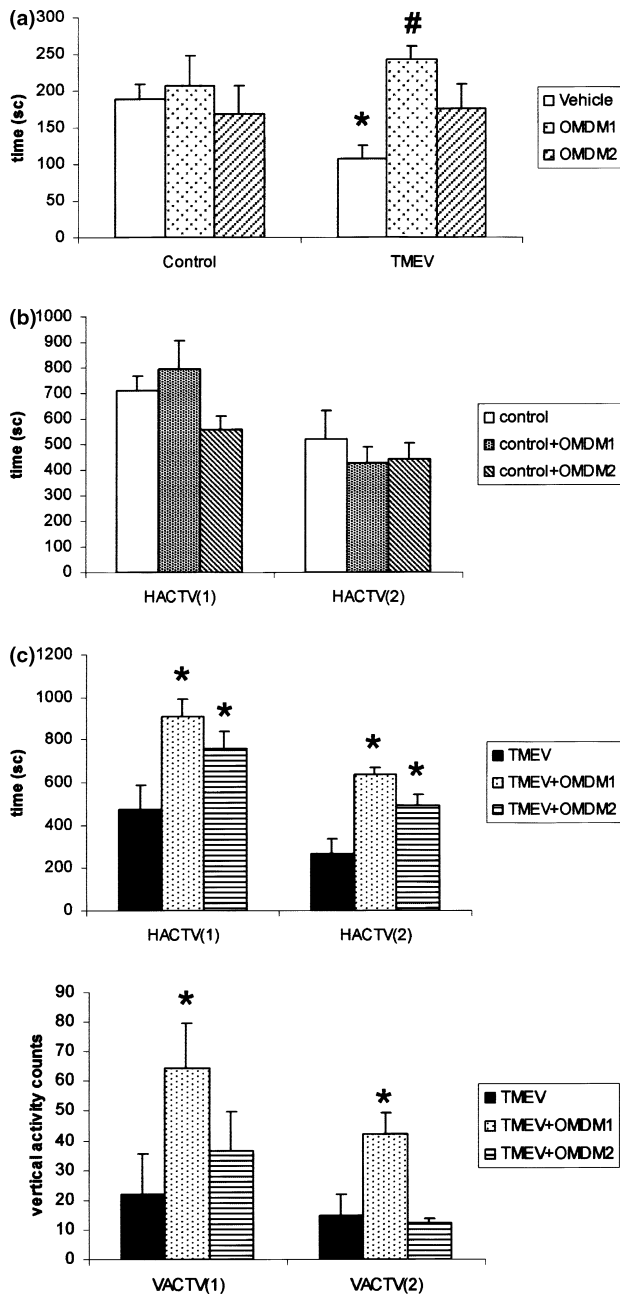
The levels of endocannabinoids in the spinal cords of vehicle- and inhibitor-treated TMEV-infected mice, and in vehicle- and

TMEV-infected macrophages, were measured by means of isotope-dilution liquid chromatography coupled to atmospheric pressure chemical ionization mass spectrometry. Lipid extracts from tissues (obtained from TMEV and sham mice 1 day after the treatment with the endocannabinoid uptake inhibitors) and cells, in the presence of 50 pmol each of deuterated (d8) AEA and 2-AG, were obtained and pre-purified by means of open bed silica chromatography as previously described (Fontana *et al.* 1995), whereas the endogenous levels of the two endocannabinoids were measured by isotope dilution as described previously (Di Marzo *et al.* 2000; Marsicano *et al.* 2003). Data are reported as pmol (AEA) or nmol (2-AG) per g of wet tissue weight, in the case of the spinal cords, or as pmol (for both endocannabinoids) per mg of lipid extract, in the case of macrophages,  $\pm$ SEM, and were compared by ANOVA followed by the Bonferroni's test. In the case of the spinal cord, treatments with OMDM-1 and OMDM-2 (at the 7 mg/kg dose) were carried out using the same conditions used to assess motor behaviour.

## Results

#### Treatment with OMDM1 or OMDM2 improves motor function during established neurological symptomatology

Previous studies described poor ability to perform the rotarod test after demyelination induced by TMEV infection (McGavern *et al.* 1999, 2000). Accordingly, TMEV-infected mice exhibited significantly reduced ( $p < 0.01$ ) ability in rotarod performance compared to control mice (Fig. 1a). To evaluate the effects of OMDM1 and OMDM2 we used two schedule doses, 2 mg/kg and 7 mg/kg. Both doses were effective in improving rotarod performance in the case of OMDM1. Figure 1(a), shows the results corresponding to the dose of 7 mg/kg 1 day after a 10-day treatment protocol with OMDM1 and OMDM2. As can be seen, mice showed increased ability to perform the test correctly after the administration of OMDM1 for 10 consecutive days ( $p < 0.001$ ). In the case of OMDM2 the improvement in test performance did not achieve statistical significance. To further confirm the motor behavioural effects of OMDM1 and OMDM2 treatment, sham-mice (controls) and TMEV-infected mice were tested for spontaneous motor activity. The administration of OMDM1 and OMDM2 (schedule doses 2 and 7 mg/kg) did not induce significant changes in horizontal and vertical activity in sham-mice (Fig. 1b shows the results corresponding to the dose of 7 mg/kg) in agreement with previous findings in rats (de Lago *et al.* 2004). The spontaneous motor behavioural responses of OMDM1 and OMDM2 (schedule dose of 7 mg/kg) in TMEV-treated mice are shown in Fig. 1(c). The hypoactivity, as reflected by the horizontal distance (HACTV) travelled by TMEV-infected mice, was statistically counteracted by the treatment with both OMDM1 ( $p < 0.001$ ) and OMDM2 ( $p < 0.02$ ) for the first 5 min [HACTV(1)].



Results corresponding to the 5–10 min session [HACTV(2)] indicate that OMDM1 significantly improves horizontal activity ( $p < 0.001$ ), whereas OMDM2 induced increases in deambulation that are in the limit of statistical significance. The vertical activity (VACTV) was also increased after the treatment with OMDM1 ( $p < 0.05$ ) for the first 5 min session [VACTV(1)] as well as for the following 5 min [VACTV(2)], whereas OMDM2 administration did not modify this parameter. Therefore, in the activity cage test, again OMDM1 was more efficacious than OMDM2, in particular in relation with the vertical activity measurement.

**Fig. 1** The treatment with the selective inhibitors of endocannabinoids re-uptake, OMDM1 and OMDM2 (dose schedule: 7 mg/kg daily for 10 consecutive days) induce improvement of motor function 1 day after the cessation of the treatment. Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-infected mice exhibited reduced ability in rotarod performance before OMDM1 and OMDM2 treatment compared with sham animals (control). (a) Data from the rotarod assay show a significant increase in motor function of OMDM1-treated mice 1 day after the end of the 10-day treatment protocol ( $*p < 0.001$  vs. control mice;  $\#p < 0.01$  vs. TMEV-infected mice), OMDM2 administration to TMEV-infected mice increased latencies in rotarod test that did not reach statistical significance in comparison to vehicle TMEV-infected mice ( $p = 0.447$ ); (b) Horizontal activity displayed in the activity cage by non-infected mice (control) 1 day after the treatment for 10 consecutive days with vehicle, OMDM1 or OMDM2. (c) Horizontal (HACTV) and vertical (VACTV) activity displayed in the activity cage by TMEV-infected mice 1 day after the treatment for 10 consecutive days with vehicle, OMDM1 or OMDM2 ( $*p < 0.001$  vs. vehicle-TMEV-infected mice). The activity parameters were recorded every 5 min for a session of 10 min: 0–5 min (1); 5–10 min (2). Note that OMDM2 treatment increased deambulation for the session 5–10 (2), although the increments are in the limit of significance. Results are the mean  $\pm$  SEM of seven to eight mice per group.

#### Endocannabinoid levels in Theiler's murine encephalomyelitis virus-infected mice and macrophages

As shown in Table 1, treatment with OMDM-1 and, to a lesser extent, OMDM-2, significantly increased ( $p < 0.05$ ) the levels of AEA, but not 2-AG, in the spinal cords of TMEV-infected mice. Interestingly, TMEV-infection caused a significant ( $p < 0.05$ ) almost twofold enhancement of AEA levels in TMEV-infected macrophages (with only a trend towards enhancement for 2-AG), but not in the spinal cords from TMEV-infected mice (Table 1).

#### Actions of OMDM1 and OMDM2 on macrophage/microglial activation

TMEV-IDD is characterized by microglial activation in spinal cord, and cytotoxic factors produced by activated microglia have been associated with the ongoing demyelination. As shown in Fig. 2, microglial cells in the spinal cord of TMEV-infected mice show a reactive morphology in white and grey matter as assessed by immunolabelling with Mac-1. Interestingly, treatment with either OMDM1 or OMDM2 (schedule dose of 7 mg/kg) abrogated, in a similar way, microglial activation in spinal cords of TMEV-infected mice. Quantification of reactive microglia within the spinal cord showed that OMDM1 and OMDM2 induced a significant reduction in the number of reactive microglial cells 1 day after the end of the treatment. It is important to note that the schedule dose of 2 mg/kg was less effective in diminishing microglial activation (not shown).

Macrophage/microglial cells are potent antigen presenting cells within the CNS and express CB1 and CB2 receptors (Walter and Stella 2004), suggesting that these cells can

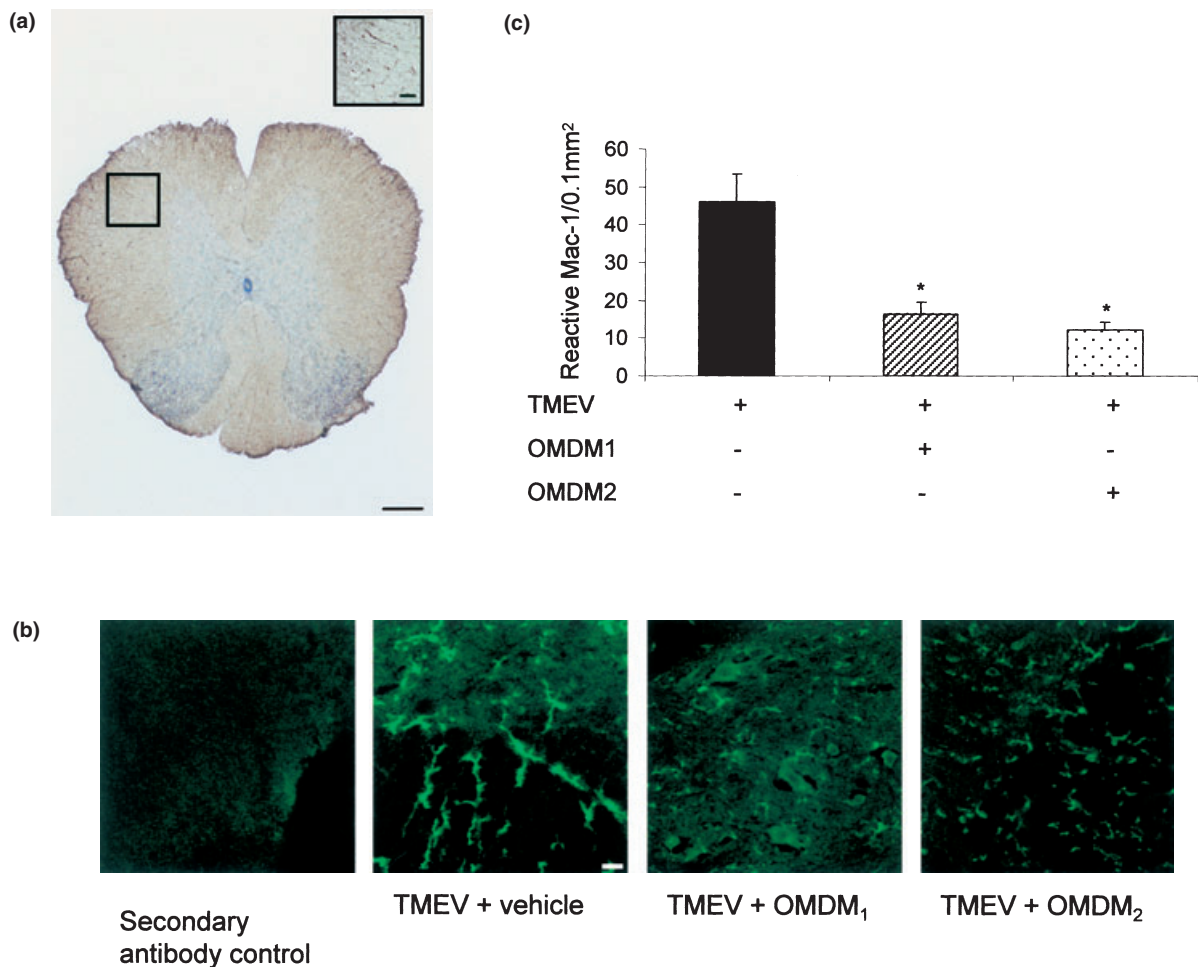
**Table 1** Levels of anandamide (AEA) and 2-arachidonoyl glycerol (2-AG) in spinal cords from Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-infected mice or in TMEV-infected macrophages (Daniel's strain, multiplicity of infection of 5 PFU per cell)

	AEA	2-AG
Spinal cord + vehicle	22.8 ± 3.7 pmol/g tissue	4.8 ± 0.8 nmol/g tissue
Spinal cord + TMEV + vehicle	28.7 ± 1.0 pmol/g tissue	3.5 ± 0.5 nmol/g tissue
Spinal cord + TMEV + OMDM1 (7 mg/kg)	45.6 ± 3.0 pmol/g tissue <sup>*†</sup>	2.8 ± 0.3 nmol/g tissue
Spinal cord + TMEV + OMDM2 (7 mg/kg)	33.6 ± 0.4 pmol/g tissue <sup>*</sup>	2.9 ± 0.1 nmol/g tissue
Macrophages + vehicle	3.4 ± 0.8 pmol/mg lipid extract	4.2 ± 0.3 pmol/mg lipid extract
Macrophages + TMEV	6.2 ± 0.9 pmol/mg lipid extract <sup>*</sup>	6.0 ± 1.9 pmol/mg lipid extract

Data are means ± SEM of  $n = 4-6$  determinations (for spinal cords) and  $n = 3$  determinations (for macrophages).

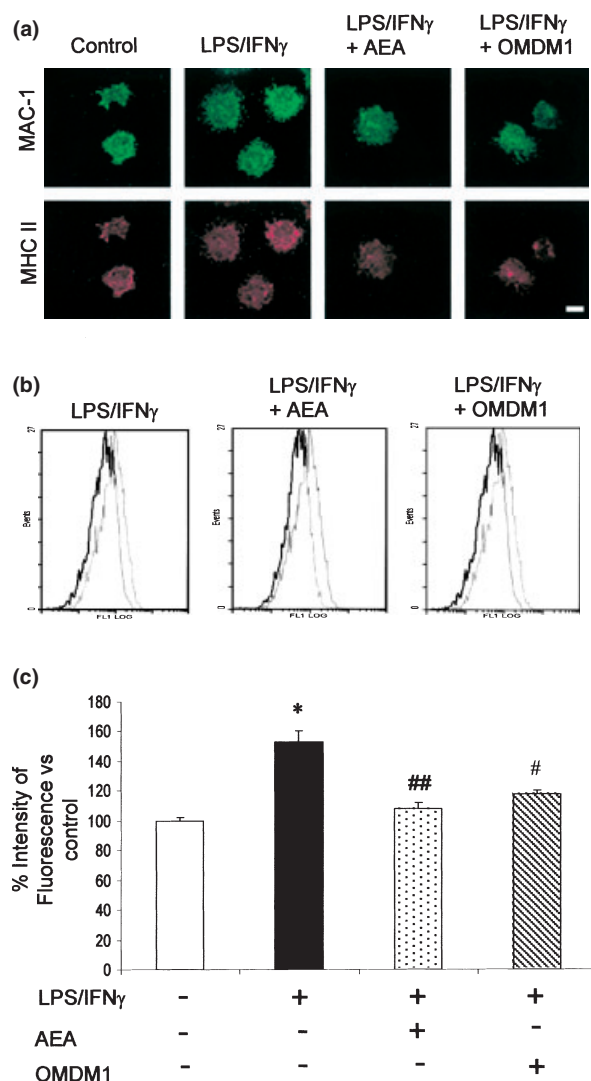
<sup>\*</sup> $p < 0.05$  vs. corresponding vehicle.

<sup>†</sup> $p < 0.05$  vs. OMDM2.



**Fig. 2** (a) Representative photomicrograph of a spinal cord section at the thoracic level from a Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)-infected mouse showing microglia/macrophages (tomato-lectin binding) and counterstained with toluidin blue. Scale bar, 50  $\mu$ m, magnification 4 $\times$ . Scale bar in insert: 50  $\mu$ m, magnification 20 $\times$ . Note that blood vessels were also stained by tomato lectin. (b) Confocal images with constant laser beam and photodetector sensitivity of microglia/macrophages (CD11b<sup>+</sup> cells) in representative

sections of ventral columns of thoracic spinal cord of TMEV-infected mice subjected to vehicle or OMDM1 and OMDM2 treatment (dose-schedule: 7 mg/kg daily for 10 consecutive days) 1 day after the cessation of the treatment. Scale bar, 50  $\mu$ m. (c) Quantification of the CD11b<sup>+</sup> cells (reactive Mac-1) in the spinal cord sections from TMEV-infected mice subjected to the different treatments. Statistical analysis:  $*p < 0.0001$  vs. TMEV.



**Fig. 3** OMDM1 abrogates murine macrophage major histocompatibility complex (MHC) class II expression induced by lipopolysaccharide (LPS)/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) activated cells. (a) Representative immunofluorescence confocal laser scanning micrographs showing the suppression of MHC class II antigen (red) expression by Mac-1 (green) positive cells in macrophage cultures activated by LPS/IFN- $\gamma$  and treated with anandamide (AEA, 10  $\mu$ M), OMDM1 (5  $\mu$ M) as described in Materials and Methods. Scale bar, 20  $\mu$ m. (b) Representative histograms generated from flow cytometric analysis of cells after the different treatments. (c) Quantification of MHC Class II molecule expression by flow cytometric analysis after the different treatments, expressed as mean values  $\pm$  SEM from three independent experiments performed in duplicate. \* $p$  < 0.002 vs. control; ## $p$  < 0.005; # $p$  < 0.01 vs. LPS/IFN- $\gamma$  activated macrophages.

respond to endocannabinoids. MHC class II molecules on macrophage cell surface play a critical role in the initiation of acquired immune response against TMEV (Olson *et al.* 2001). Recently, an increase in AEA production by LPS-activated macrophages has been described (Liu *et al.* 2003), and we

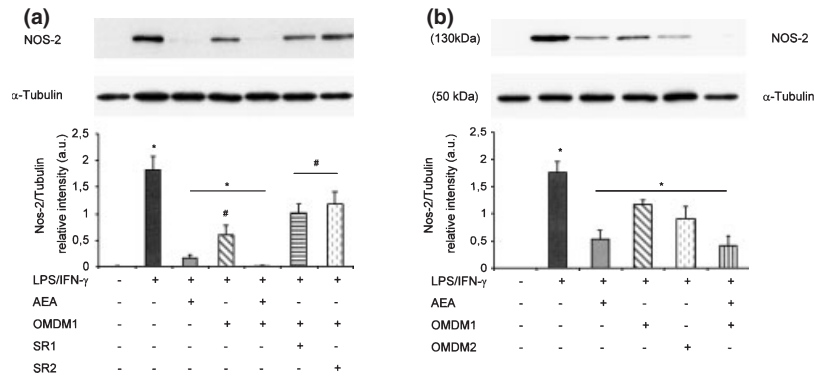
have found here that TMEV infection also increases AEA levels in macrophages. Therefore, we next investigated whether the AEA transporter inhibitor, OMDM1 at the dose of 5  $\mu$ M, affect the expression of MHC class II molecules in activated macrophages (Fig. 3). As expected, LPS/IFN- $\gamma$  treatment induced the expression of H-2A antigens in Mac positive staining cells. Exposure to AEA, as well as the treatment with OMDM1, prevented MHC class II expression, as indicated by the decreased immunoreactivity for this antigen (Fig. 3a). These results were confirmed by flow cytometric analysis, as we measured MHC class II antigen expression by direct staining in LPS/IFN- $\gamma$  activated cells in the presence or absence of AEA or OMDM1. As shown in Fig. 3b, there was a reduction in the expression of MHC class II antigen in cells treated with AEA or OMDM1. Quantification data (Fig. 3c) revealed a significant decreased expression of MHC class II antigen by AEA ( $p$  < 0.005) or OMDM1 ( $p$  < 0.01).

### OMDM1 and OMDM2 inhibit nitric oxide synthase-2 expression in activated macrophages

Activation of macrophages by LPS/IFN- $\gamma$  resulted in the expression of NOS-2 as measured by western blotting. However, this stimulatory effect was abolished by pretreatment of cell cultures with AEA ( $p$  < 0.001). The addition of the inhibitor of AEA transporter, OMDM1, at the dose of 10  $\mu$ M also reduced NOS-2 expression ( $p$  < 0.001), but to a lesser extent than AEA. When OMDM1 was added to activated macrophages treated with AEA, an enhancement of AEA effects were observed ( $p$  < 0.001) (Fig. 4a). We next examined whether the cannabinoid receptors are involved in the inhibition of NOS-2 expression in macrophages. Exposure of cells to SR141716A or SR144528 alone at doses of 1  $\mu$ M did not modify significantly NOS-2 expression induced by LPS/IFN- $\gamma$ , although SR141716A caused a slight increase of the protein (not shown). However, we found that the addition of both SR141716A, a CB1 receptor antagonist, or SR144528, a CB2 receptor antagonist, partially prevented ( $p$  < 0.05) the inhibition of NOS-2 expression elicited by OMDM1 (Fig. 4a). These results indicate that the actions of OMDM1 on NOS-2 expression may involve both CB1 and CB2 receptors. In order to discard putative direct effects of OMDM1 and OMDM2 on cannabinoid receptors we performed a set of experiments using the above transporter inhibitors at a concentration of 5  $\mu$ M. This dose, which is inactive on both CB1 and CB2 receptors (Ortner *et al.* 2003), was still effective ( $p$  < 0.05), for both compounds, at decreasing the expression of NOS-2, and OMDM1 also exhibited a trend towards the enhancement of AEA effects (Fig. 4b).

### OMDM1 and OMDM2 decrease interleukin-1 $\beta$ production by activated macrophages

OMDM1 and OMDM2 were next compared for their ability to affect critical cytokine production by LPS/IFN- $\gamma$



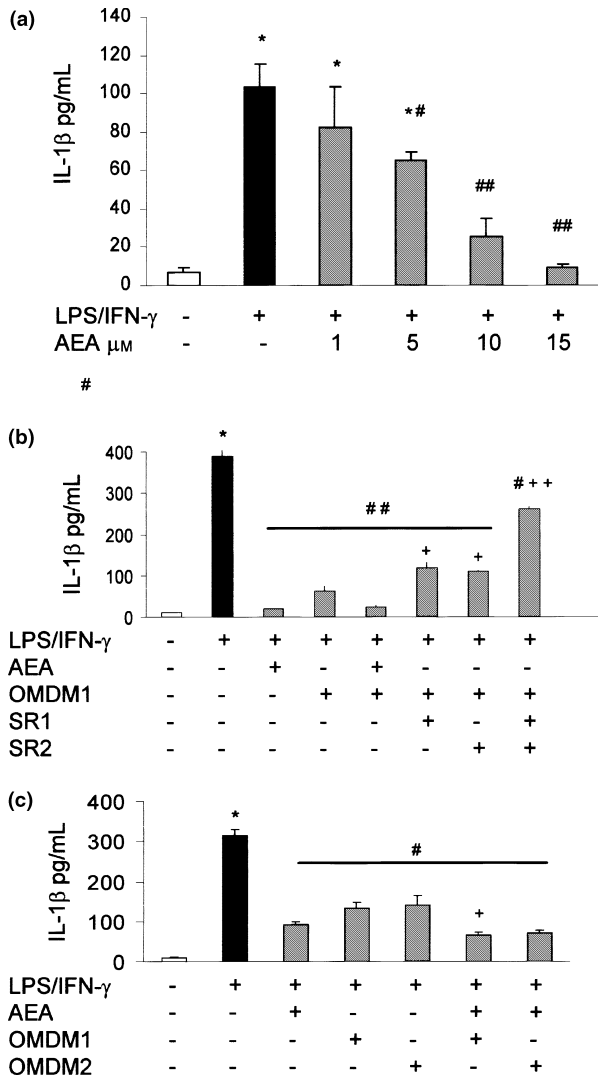
**Fig. 4** Inhibition of nitric oxide synthase (NOS-2) expression by OMDM1 and OMDM2 in lipopolysaccharide (LPS)/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )-treated murine macrophages. (a) Representative western blot of NOS-2 in macrophage cultures in basal and LPS/IFN- $\gamma$  activated conditions in the absence or presence of anandamide (AEA, 10  $\mu$ M), OMDM1 (10  $\mu$ M), AEA + OMDM1, OMDM1 + SR1 (antagonist CB1 receptors: 1  $\mu$ M) or OMDM1 + SR2 (antagonist CB2 receptors: 1  $\mu$ M). Cells were stimulated with LPS/IFN- $\gamma$  for 18 h and incubated in the presence of the different compounds as described in Materials and Methods. After treatments, cells were washed and lysed in buffer lysis. Proteins in cell lysates were resolved on 10% sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis and subjected to immunoblot analysis (30  $\mu$ g protein/lane) using antibodies against the indicated proteins (NOS-2,

dilution, 1 : 2000 and  $\alpha$ -tubulin, dilution, 1 : 40000). Densitometric data represent the mean  $\pm$  SEM of three independent experiments performed in separate cell preparations and in triplicate (statistical significances: \* $p$  < 0.001 vs. control or LPS/IFN- $\gamma$ ; # $p$  < 0.05 vs. LPS/IFN- $\gamma$  + AEA or LPS/IFN- $\gamma$  + OMDM1; \* $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$  + AEA. (b) Representative western blot of NOS-2 in macrophage cultures in the absence or presence of AEA (1  $\mu$ M) and OMDM1 or OMDM2 at the dose of 5  $\mu$ M. Densitometric analysis of two independent experiments in triplicate indicated a significant effect of OMDM1 and OMDM2 in suppressing NOS-2 expression (\* $p$  < 0.0001 vs. control; \* $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$ ). Immunoblotting for  $\alpha$ -tubulin was carried out to ensure equal loading of protein and data are expressed by density ratios to  $\alpha$ -tubulin bands.

activated macrophages (Fig. 5). Unstimulated macrophages expressed low levels of IL-1 $\beta$ , but the stimulation with LPS/IFN- $\gamma$  significantly up-regulated its biosynthesis ( $p$  < 0.001). LPS/IFN- $\gamma$ -stimulated production of IL-1 $\beta$  was down-regulated by the presence of AEA (1–15  $\mu$ M) in a dose–response manner (Fig. 5a). The lowest effective dose of AEA was 5  $\mu$ M ( $p$  < 0.05), but AEA at 10  $\mu$ M and 15  $\mu$ M induced a marked inhibition ( $p$  < 0.001) of IL-1 $\beta$  generation by activated macrophages, as revealed by the low amounts of IL-1 $\beta$  measured in the culture media. A significantly decreased IL-1 $\beta$  production ( $p$  < 0.001) was also observed following exposure of cells to OMDM1 at a 10  $\mu$ M concentration (Fig. 5b). Incubation of cells with 1  $\mu$ M of SR141716A caused a small increase in LPS-induced IL-1 $\beta$  production, whereas incubation with SR144528 did not affect IL-1 $\beta$  content (LPS/IFN- $\gamma$ : 312.26  $\pm$  5.9 pg/mL; SR141716A + LPS/IFN- $\gamma$ : 364.38  $\pm$  7.5 pg/mL; SR144528 + LPS/IFN- $\gamma$ : 327.50  $\pm$  5.2 pg/mL). The results obtained with OMDM1 in the presence of CB1 (SR141716A) or CB2 (SR144528) receptor antagonists indicate a partial blockade ( $p$  < 0.05) of OMDM1 effects, suggesting the participation of both types of receptors. The combined exposure of SR141716A and SR144528 confirmed the involvement of both receptors, as a much greater blockade was observed ( $p$  < 0.001). Addition of SR141716A or SR144528 partially reversed the inhibitory effects of AEA 5  $\mu$ M on IL-1 $\beta$  secretion by stimulated macrophages (LPS/IFN- $\gamma$ : 114.25  $\pm$  16.4 pg/mL; AEA +

LPS/IFN- $\gamma$ : 71.75  $\pm$  7.02 pg/mL,  $p$  < 0.05; SR141716A + AEA + LPS/IFN- $\gamma$ : 90.5  $\pm$  4.44 pg/mL,  $p$  < 0.05), whereas, the combined treatment with both antagonists completely blocked AEA effects (SR141716A + SR144528 + AEA + LPS/IFN- $\gamma$ : 104.75  $\pm$  7.36 pg/mL). Figure 5(c) shows the results obtained when using a concentration of 5  $\mu$ M for either OMDM1 or OMDM2. At this dose, both compounds were still able to inhibit IL-1 $\beta$  biosynthesis ( $p$  < 0.001). Interestingly, OMDM1 and OMDM2 also potentiated AEA-induced IL-1 $\beta$  inhibition ( $p$  < 0.05). This observation is consistent with the hypothesis that the OMDM compounds act by inhibiting the inactivation of AEA, be it endogenously produced, as in TMEV-infected macrophages, or exogenous. We then assessed whether infection of macrophages from SJL/J mice with TMEV, under the same conditions leading to increased AEA levels (see above), would result in increased production of IL-1 $\beta$ , and if so, what was the effect of AEA and OMDM1. As expected, TMEV-infected macrophages contain high levels of IL-1 $\beta$  compared with uninfected cells (TMEV: 465.0  $\pm$  86.7 pg/mL vs. control: 12.7  $\pm$  4.2 pg/mL;  $p$  < 0.0001). The treatment with AEA (10  $\mu$ M) elicited an important decrease of IL-1 $\beta$  content in the cell supernatants (AEA + TMEV: 192.3  $\pm$  38.9 pg/mL;  $p$  < 0.001 vs. TMEV), whereas the addition of OMDM1 (10  $\mu$ M) decreased IL-1 $\beta$  levels to a lesser extent (OMDM1 + TMEV: 338.3  $\pm$  57.5 pg/mL;  $p$  < 0.05 vs. TMEV).





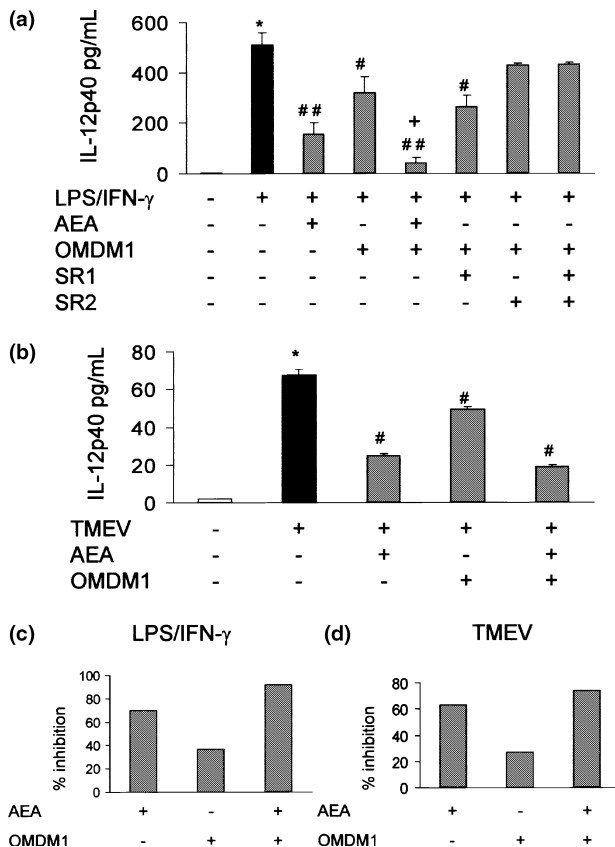
**Fig. 5** Effects of OMDM1 and OMDM2 on interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) production by lipopolysaccharide (LPS)/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) activated macrophages. (a) Effects of increasing doses of anandamide (AEA, 1–15  $\mu$ M) on IL-1 $\beta$  production by macrophages stimulated with LPS/IFN- $\gamma$  as described in Methods. Incubation was continued for 18 h. Supernatants were assayed for IL-1 $\beta$  release by ELISA. Statistics: \* $p$  < 0.001 vs. control; # $p$  < 0.05, ## $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$ . (b) Macrophage cultures production of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) were treated with different doses of anandamide (AEA, 10  $\mu$ M), OMDM1 (10  $\mu$ M), AEA + OMDM1, OMDM1 + SR1 (antagonist CB1 receptors), OMDM1 + SR2 (antagonist CB2 receptors), and OMDM1 + SR1 + SR2, before stimulation with LPS/IFN- $\gamma$ , as described in Methods. Incubation was continued for 18 h. Supernatants were assayed for IL-1 $\beta$  release by ELISA. Statistics: \* $p$  < 0.001 vs. control; ## $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$ ; # $p$  < 0.05 vs. LPS/IFN- $\gamma$ ; \* $p$  < 0.05; \*\* $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$  + OMDM1. (c) Macrophage cultures were treated with AEA (1  $\mu$ M), OMDM1 (5  $\mu$ M), OMDM2 (5  $\mu$ M), or AEA + OMDM1, before stimulation with LPS/IFN- $\gamma$ . Incubation was continued for 18 h. Supernatants were assayed for IL-1 $\beta$  release by ELISA. Statistics: \* $p$  < 0.001 vs. control; # $p$  < 0.001 vs. LPS/IFN- $\gamma$ ; \* $p$  < 0.05 vs. LPS/IFN- $\gamma$  + AEA.

### Effects of OMDM1 on interleukin-12 p40 protein production by macrophages stimulated with lipopolysaccharide/interferon- $\gamma$ or infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus

IL-12 is a cytokine primarily produced by monocytes and macrophages, and plays an essential role in the development of cell mediated immunity by stimulating T helper type I immune responses (Hsieh *et al.* 1993). This cytokine is a heterodimer of p35 and p40 subunits, and secretion of p40 is limited to cells of macrophage/monocyte lineage and occurs only after activation of these cells. Here, we examined the effect of AEA and OMDM1 on the production of IL-12 subunit p40 by LPS/IFN- $\gamma$  stimulated macrophages. As shown in Fig. 6(a), LPS/IFN- $\gamma$  significantly stimulated the production of IL-12p40, as indicated by the increased levels of this cytokine in cell supernatants. Treatment with AEA resulted in a strong decrease of LPS/IFN- $\gamma$ -induced IL-12p40 ( $p$  < 0.0001), whereas the exposure to OMDM1 (5  $\mu$ M) decreased IL-12p40 release, albeit to a lesser degree ( $p$  < 0.003). The combination of AEA/OMDM1 induced a significant synergistic suppression of IL-12p40 ( $p$  < 0.001). To examine whether a cannabinoid receptor may participate in the IL-12 p40 inhibition, selective antagonists were again used. The inhibitory effect of OMDM1 was not abrogated by SR141716A, but a partial blockade by SR144528 alone or the combination of both antagonists was observed without reaching statistical significance ( $p$  = 0.065), although it is noteworthy that the combination of OMDM1 with either SR144528 alone or the two antagonists together was no longer significantly different from LPS/IFN- $\gamma$ -treated cells. To further confirm the importance of IL-12 in the immune responses to TMEV, we performed experiments using macrophages subjected to TMEV infection, which we have shown here to over-produce AEA, in the presence of AEA and/or OMDM1. Figure 6(b) shows that viral infected cells release a marked amount of IL-12p40 ( $p$  < 0.001), which was significantly blunted by treatment with AEA ( $p$  < 0.001). Treatment with OMDM1 (10  $\mu$ M) also reduced IL-12p40 production by TMEV-infected macrophages, but again to a lesser extent. Figure 6(c), shows the percentage of IL-12p40 inhibition following AEA (70%), OMDM1 (38%) and AEA + OMDM1 (90%) by LPS/IFN- $\gamma$  stimulated macrophages. Interestingly, in the case of TMEV infection the extent of IL-12 inhibition elicited by the cannabinoid compounds are similar to those observed following LPS/IFN- $\gamma$  stimulation (Fig. 6d).

### Discussion

In this study we show that two selective inhibitors of the putative endocannabinoid transporter, OMDM1 and OMDM2, provide an effective protection against the symptoms and, possibly, the progress of TMEV-IDD, a viral murine experimental model for MS. Treatment of



**Fig. 6** Effects of OMDM1 and OMDM2 on interleukin-12 subunit p40 (IL-12p40) production by activated macrophages (a) Effect of anandamide (AEA), OMDM1, AEA + OMDM1, OMDM1 + SR1 (antagonist CB1 receptors); OMDM1 + SR2 (antagonist CB2 receptors) and OMDM1 + SR1 + SR2 on IL-12p40 protein production in primary mouse macrophages stimulated with lipopolysaccharide (LPS)/interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) for 18 h. Supernatants were collected and assayed for IL-12p40 content by ELISA. Statistics: \* $p < 0.001$  vs. control; ### $p < 0.001$  vs. LPS/IFN- $\gamma$ ; # $p < 0.003$  vs. LPS/IFN- $\gamma$ ; \* $p < 0.05$  vs. LPS + AEA; (b) Effect of AEA, OMDM1 and AEA + OMDM1 on IL-12p40 protein production in primary mouse macrophages after Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV) infection (Daniel's strain, multiplicity of infection of 5 PFU per cell). Supernatants were harvested 24 h post-infection and assayed for IL-12p40 by ELISA. Statistics: \* $p < 0.001$  vs. uninfected cultures; # $p < 0.001$  vs. TMEV. (c) Percentage of IL-12 p40 inhibition elicited by AEA, OMDM1, and AEA + OMDM1 in LPS/IFN- $\gamma$  stimulated macrophages. (d) Percentage of IL-12 p40 inhibition elicited by AEA, OMDM1 and AEA + OMDM1 in macrophage cultures infected with TMEV.

TMEV-infected mice with OMDM2 and, particularly, OMDM1 ameliorated motor symptoms. This was associated with: (i) an up-regulation of AEA levels, which was more efficacious with OMDM1, and (ii) a down-regulation of inflammatory responses in the spinal cord of TMEV-infected mice. Several pieces of evidence indicate that exogenous and endogenous cannabinoids modulate the functions of immune cells in experimental *in vitro* and *in vivo* models (Berdyshev

2000; Klein *et al.* 2003). In particular, a diminished macrophage activity by cannabinoids has been postulated (McCoy *et al.* 1999). Here we showed that AEA levels are significantly increased in macrophages infected with TMEV, and that OMDM1 and OMDM2 down-regulate macrophage function by: (i) decreasing the surface expression of MHC class II molecules, (ii) inhibiting NOS-2 expression, and (iii) reducing the production of pro-inflammatory cytokines, such as IL-1 $\beta$  and IL-12p40 by activated macrophages.

Previous studies have demonstrated that CB1 and CB2 cannabinoid agonists ameliorate spasticity and tremors in the CREAE model of MS (Baker *et al.* 2000). The increased levels of AEA and 2-AG in spastic mice suggest an involvement of endocannabinoid system, which may participate as an endogenous protective mechanism (Baker *et al.* 2001). This hypothesis is supported by the finding that CB1-deficient CREAE mice exhibit a higher degree of neuronal damage than they wild-type littermates (Pryce *et al.* 2003). Here we found that TMEV infection, which does not result in chronic-relapsing spasticity as in the CREAE model, does not cause a significant enhancement of endocannabinoid levels in the spinal cord of the diseased mice. This is in agreement with the previous finding of enhanced endocannabinoid levels being associated with spasticity rather than with the disorder itself (Baker *et al.* 2001). Instead, TMEV-infection does seem to produce an enhancement of endocannabinoid tone in macrophages, thus suggesting that increased endocannabinoid levels might be an adaptive reaction aimed at inhibiting the inflammatory responses. Indeed, the results of the present study, in which the treatment with inhibitors of AEA cellular re-uptake both improved motor function and reduced inflammatory responses in microglia/macrophages, support the concept that a potentiation of the endocannabinoid tone has beneficial effects on the severity of both neurological and inflammatory MS-like symptoms (Baker *et al.* 2001). The stimulation of endocannabinoid action on neural circuits involved in motor control is probably one of the causes of the amelioration of motor deficits observed in TMEV-infected mice. In support of this hypothesis is the observation that, although both OMDM1 and OMDM2 improve motor behaviour, OMDM1 [which of the two compounds is the one completely inactive as a 'direct' CB1 agonist (Ortar *et al.* 2003)] was more effective in the two motor behavioural tests used, and was also the one that more efficiently elevated AEA levels in the spinal cord of TMEV-infected mice. Furthermore, previous work from our group (Arévalo-Martín *et al.* 2003) showed that cannabinoid receptor agonists reduced the number of reactive microglia, suppressed microglial MHC class II expression and diminished CD4<sup>+</sup> T cell infiltration within the spinal cord of TMEV-infected mice, and led to a clear motor function recovery. In support of the beneficial immunoregulatory properties of cannabinoids in the TMEV-IDD model, Croxford and Miller (2003) described a diminished clinical



disease score associated with down-regulation of Th1-mediated viral and myelin responses, and thus decreased expression of mRNA encoding for proinflammatory cytokines. In our case, however, because improvement of motor activity was achieved with the two schedule doses treatment of OMDM1 and OMDM2, and down-regulation of microglial reactivity was only significantly after the higher dose schedule treatment, it is reasonable to postulate that the effects on motor behaviour induced by OMDM1 and OMDM2 are dependent only in part from inflammatory conditions within the spinal cord. Because the intermediacy of cannabinoid CB1 and CB2 receptors in the actions of the two inhibitors was only demonstrated *in vitro*, we cannot rule out the possibility that part of the effects observed *in vivo* are unrelated to the ones observed *in vitro* and are not mediated by indirect activation of cannabinoid receptors by OMDM1 and OMDM2, particularly as AEA has been shown to activate other targets beside CB1 and CB2 receptors (Di Marzo *et al.* 2000).

In an attempt to elucidate the possible mechanism(s) underlying the inhibition of macrophage/microglial reactivity by the endocannabinoid transporter inhibitors, we performed experiments *in vitro* with macrophage cultures. One of the most important finding was that OMDM1 and OMDM2 suppressed the expression of MHC class II molecules induced by IFN- $\gamma$ /LPS. These effects are particularly interesting if one considers the role of macrophages in TMEV-IDD. Macrophages are an important reservoir of TMEV and depletion of macrophages prevents chronic demyelination from commencing (Pena-Rossi *et al.* 1997). Macrophages/microglia express CB1 and CB2 receptors, indicating that these cells are sensitive to alteration in endocannabinoid levels during neuroinflammation (Walter and Stella 2004). Although recent studies postulated that 2-AG is the main endocannabinoid involved in microglial cell migration and proliferation (Walter *et al.* 2003; Carrier *et al.* 2004), the fact that inflammatory stimuli such as LPS increase the production of AEA by macrophages (Wagner *et al.* 1997; Di Marzo *et al.* 1999) indicates the possibility of a regulatory role of this endocannabinoid on macrophage function. The results of the present study support this notion, because macrophages infected with TMEV overproduced AEA selectively over 2-AG, and macrophage exposure to AEA, OMDM1 or OMDM2 was able to inhibit NOS-II expression. Activated macrophages/microglia produce important amounts of nitric oxide (NO), which may act as a cytotoxic effector molecule in demyelinating diseases. Both endogenous NO released by macrophages/microglia and NO generated from exogenous donors induce oligodendrocyte death (Mitrovic *et al.* 1995; Boullenne *et al.* 1999; Molina-Holgado *et al.* 2001). Cannabinoids have been reported to increase NO production from monocytic cells (Stefano *et al.* 1996) and to decrease NO generation by activated macrophages (Jeon *et al.* 1996),

microglial cells (Waksman *et al.* 1999) and TMEV-infected astrocytes (Molina-Holgado *et al.* 1997). Because, in our study, AEA per se induced the suppression of NOS-2 expression and OMDM1 enhanced this effect, we propose that the increase in availability of AEA caused by the inhibition of its reuptake is responsible for diminished NOS-2 expression. In agreement with this finding, macrophages are known to contain a putative endocannabinoid transporter (Bisogno *et al.* 1997), and the effect of OMDM1 in our study was partially antagonized by the CB1 and CB2 antagonists, SR141716A or SR144528. Furthermore, we found that OMDM1, which in previous studies was inactive on CB1 and CB2 receptors up to a 10  $\mu$ M concentration (Ortar *et al.* 2003), was still capable of producing these effects at a 5  $\mu$ M concentration.

We have also provided data showing that AEA, OMDM1 and OMDM2 diminish IL-1 $\beta$  production by LPS/IFN- $\gamma$  activated macrophages. The potentiation of the AEA-induced inhibition of IL-1 $\beta$  by OMDM1 is in good agreement with the idea of a common mechanism of action in the suppression of IL-1 $\beta$  production. IL-1 $\beta$  has been considered as a mediator of experimentally induced brain damage, and is expressed initially by microglia/macrophages and later by astrocytes (Davies *et al.* 1999). Interestingly, the endogenous IL-1 receptor antagonist, which limits IL-1 $\beta$  action, has been reported to mediate the neuroprotective and anti-inflammatory actions of CBs in neurones and glia. (Molina-Holgado *et al.* 2003). Other studies have described that exogenous and endogenous cannabinoids inhibit the expression of mRNA for several cytokines including IL-1 $\beta$  by macrophages and microglial cells (Klein *et al.* 2000; Puffenberger *et al.* 2000), but the type of cannabinoid receptors involved remained to be established. In the present study, our results suggest the involvement of both CB1 and CB2 receptors, although we do not exclude the participation of other putative cannabinoid-like receptors. Furthermore, the decreased IL-12p40 release from TMEV-infected infected macrophages after AEA or OMDM1 is consistent with the immunomodulatory role proposed for the endocannabinoids. Production of IL-12p40 occurs during both innate and acquired immunity, and this cytokine brings about the development of Th1 CD4<sup>+</sup> T cells from naïve CD4<sup>+</sup> T cells. Therefore, the up-regulation of IL-12p40 biosynthesis after infection of macrophages with TMEV would contribute to the activation and differentiation of Th1 cells, which constitutes the major immune response in the CNS of TMEV (Pope *et al.* 1996). The blunted IL-12p40 release by AEA and OMDM1 may have important implications for the initial inflammatory response as well as for the ensuing adaptative immune response to viral antigens and subsequently to TMEV-induced demyelination. We have also shown that IL-12p40 production by LPS/IFN- $\gamma$  activated macrophages was blocked by AEA, and that OMDM1 significantly potentiated this effect. Collectively, these results

indicate that OMDM1 and OMDM2, by retarding the inactivation of endogenous cannabinoid receptor agonists, exhibit important anti-inflammatory properties in macrophages that might be useful for the therapeutic treatment of chronic inflammatory disorders. This conclusion seems to be further supported by our own unpublished observations showing an increased IL-10 production by AEA under inflammatory conditions using different cell preparations (Raw 264.7, macrophages and primary microglial cells, C. Guaza, unpublished data).

In conclusion, we have shown that, in a widely employed murine model of MS, OMDM1 and OMDM2 can efficaciously: (i) alleviate motor deficits, and (ii) afford protection from neuroinflammation by targeting macrophage/microglial function. Four types of observations indicate that OMDM1 and OMDM2 act by inhibiting endocannabinoid inactivation and, subsequently, by inducing/strengthening an endocannabinoid tone: (i) the rank of efficacy of the two compounds (which differ only by their stereochemistry) in this study, and the fact that one of them is active *in vitro* at a concentration totally inactive on cannabinoid receptors, rules out their action via direct activation of these receptors; (ii) the fact that enhanced endocannabinoid synthesis has been previously demonstrated both *in vivo*, in an animal model of MS, and *in vitro*, in LPS-stimulated and, in the present study, in TMEV-infected macrophages; (iii) the present finding that the effects of OMDM1 and OMDM2 on macrophages are attenuated by cannabinoid receptor antagonists; and (iv) the present finding that both compounds enhance AEA levels in the spinal cord of diseased mice, and do so with relative efficacies that are identical to their relative efficacies at contrasting MS-like motor symptoms. Further studies are therefore warranted to establish the endogenous cannabinoid system as a therapeutic target for the treatment of demyelinating diseases.

## Acknowledgements

We gratefully appreciated Dr Moses Rodriguez (Department of Immunology and Neurology, Mayo Clinic/Foundation, Rochester, Minnesota, USA) for gentle delivery of Theiler's virus DA strain. This work was supported by grants from the Ministerio de Ciencia y Tecnología (MCYT, Spain, SAF-2001/1246) and Ministero Italiano per l'Università e la Ricerca (MIUR-FIRB, to VDM). We express our gratitude to R. Fernandez-Senso, C. Bailón, C. Hernandez and S. Petrosino for their technical assistance. We also thank Pedro Lastres for his help in cytometric analysis (CIB; CSIC). FC was supported by a fellowship from the Fundación Carolina (MEC).

## References

Arévalo-Martín A., Vela J. M., Molina-Holgado E., Borrell J. and Guaza C. (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 2511–2516.

- Baker D., Pryce G., Croxford J. L., Brown P., Pertwee R. G., Huffman J. W. and Layward L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **404**, 84–87.
- Baker D., Pryce G., Croxford J. L. *et al.* (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* **15**, 300–302.
- Berdyshev E. V. (2000) Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids* **108**, 169–190.
- Bisogno T., Maurelli S., Melck D., De Petrocellis L. and Di Marzo V. (1997) Biosynthesis, uptake, and degradation of anandamide and palmitoylethanolamide in leukocytes. *J. Biol. Chem.* **272**, 3315–3323.
- Boullerne A. I., Nedelkoska L. and Benjamins J. A. (1999) Synergism of nitric oxide and iron in killing the transformed murine oligodendrocyte cell line N20.1. *J. Neurochem.* **72**, 1050–1060.
- Breivogel C. S., Griffin G., Di Marzo V. and Martín B. R. (2001) Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.* **60**, 155–163.
- Carrier E. J., Kearns C. S., Barkmeier A. J., Breese N. M., Yang W., Nithipatikorn K., Pfister S. L., Campbell W. B. and Hillard C. J. (2004) Cultured rat microglial cells synthesize the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-dependent mechanism. *Mol. Pharmacol.* **65**, 999–1007.
- Compton A. and Coles A. (2002) Multiple Sclerosis. *Lancet* **359**, 1221–1231.
- Croxford J. L. and Miller S. D. (2003) Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R(+) WIN55,212. *J. Clin. Invest.* **111**, 1231–1240.
- Davies C. A., Loddick S. A., Toulmond S., Stroemer R. P., Hunt J. and Rothwell N. J. (1999) The progression and topographic distribution of interleukin-1 beta expression after permanent middle cerebral artery occlusion in the rat. *J. Cereb. Blood Flow Metab.* **19**, 87–98.
- Devane W. A., Hanus L., Breuer A., Pertwee R. G., Stevenson L. A., Griffin G., Gibson D., Mandelbaum A., Etingen A. and Mechoulam R. (1992) Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science* **258**, 1946–1949.
- Di Marzo V., Melck D., Bisogno T. and De Petrocellis L. (1998) Endocannabinoids: endogenous cannabinoid receptor ligands with neuromodulatory action. *Trends Neurosci.* **21**, 521–528.
- Di Marzo V., Bisogno T., De Petrocellis L., Melck D., Orlando P., Wagner J. A. and Kunos G. (1999) Biosynthesis and inactivation of the endocannabinoid 2-arachidonoylglycerol in circulating and tumoral macrophages. *Eur. J. Biochem.* **264**, 258–267.
- Di Marzo V., Breivogel C. S., Tao Q., Bridgen D. T., Razdan R. K., Zimmer A. M., Zimmer A. and Martin B. R. (2000) Levels, metabolism and pharmacological activity of anandamide in CB1 cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB1, non-CB2 receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.* **75**, 2434–2444.
- Fontana A., Di Marzo V., Cadas H. and Piomelli D. (1995) Analysis of anandamide, an endogenous cannabinoid substance, and of other natural *N*-acylethanolamines. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **53**, 301–308.
- Howlett A. C., Barth F., Bonner T. I. *et al.* (2002) Classification of cannabinoid receptor. *Pharmacol. Rev.* **54**, 161–202.
- Hsieh C. S., Macatonia S. E., Tripp C. S., Wolf S. F., O'Garra A. and Murphy K. M. (1993) Development of Th1 CD4 T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages. *Science* **260**, 547–551.
- Jeon Y. J., Yang K. H., Pulaski J. T. and Kaminski N. E. (1996) Attenuation of inducible nitric oxide synthase gene expression by delta 9-tetrahydrocannabinol is mediated through the inhibition of nuclear factor-kappa B/Rel activation. *Mol. Pharmacol.* **50**, 334–341.

- Johnson R. T. (1994) The virology of demyelinating diseases. *Ann. Neurol.* **36**, 54–60.
- Klein T. W., Lane B., Newton C. and Friedman H. (2000) The cannabinoid system and cytokine network. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **225**, 1–8.
- Klein T. W., Newton C., Larsen K., Lu L., Perkins I., Nong L. and Friedman H. (2003) The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukoc. Biol.* **74**, 1–11.
- de Lago E., Ligresti A., Ortat G., Morera E., Cabranes A., Pryce G., Bifulco M., Baker D., Fernandez-Ruiz J. and Di Marzo V. (2004) In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur. J. Pharmacol.* **484**, 249–257.
- Liu J., Bátkai S., Pacher P., Harvey-White J., Wagner J. A., Cravatt B. J., Gao B. and Kunos G. (2003) LPS induces anandamide synthesis in macrophages via CD14/MAPK/PI3K/NFkB independently of platelet activating factor. *J. Biol. Chem.* **278**, 45 034–45 039.
- Marsicano G., Goodenough S., Monory K. *et al.* (2003) CB1 cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**, 84–88.
- Matsuda L. A., Lolait S. J., Brownstein M. J., Young A. C. and Bonner T. I. (1990) Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature* **346**, 561–564.
- McCoy K. L., Matmeyer M., Carlisle S. J. and Cabral G. A. (1999) Cannabinoid inhibition of the processing of intact lysozyme by macrophages: evidence for CB2 receptor participation. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **289**, 1620–1625.
- McGavern D. B., Zoecklein L., Drescher K. M. and Rodriguez M. (1999) Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp. Neurol.* **158**, 171–181.
- McGavern D. B., Murray P. D., Rivera-Quiñones C., Schmelzer J. D., Low P. A. and Rodriguez M. (2000) Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* **123**, 519–531.
- Mechoulam R., Ben Shabat S., Hanus L. *et al.* (1995) Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.* **50**, 83–90.
- Miller S. D., Vanderlugt C. L., Begolka W. S., Pao W., Yauch R. L., Neville K. L., Katz-Levy Y., Carrizosa A. and Kim B. S. (1997) Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading. *Nat. Med.* **3**, 1133–1136.
- Mitrovic B., Ignarro L., Montestrucque S., Smoll A. and Merrill J. E. (1995) Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cell in vitro. *J. Neurosci.* **61**, 575–585.
- Molina-Holgado F., Lledo A. and Guaza C. (1997) Anandamide suppresses nitric oxide and TNF- $\alpha$  responses to Theiler's virus or endotoxin in astrocytes. *Neuroreport* **8**, 1929–1933.
- Molina-Holgado E., Vela J. M., Arévalo-Martín A. and Guaza C. (2001) LPS/IFN- $\gamma$  cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 493–502.
- Molina-Holgado E., Vela J. M., Arévalo-Martín A., Molina-Holgado F., Almazán G., Borrell J. and Guaza C. (2002) Expression of cannabinoid CB1 receptors in oligodendroglial cells: activation of PI-3K/Akt signaling pathway promotes cell survival. *J. Neurosci.* **22**, 9742–9753.
- Molina-Holgado F., Pinteaux E., Moore J. D., Molina-Holgado E., Guaza C., Gibson R. M. and Rothwell N. J. (2003) Endogenous interleukin-1 receptor antagonist mediates anti-inflammatory and neuroprotective actions of cannabinoids in neurons and glia. *J. Neurosci.* **23**, 6470–6474.
- Noseworthy J. H., Lucchinetti C., Rodriguez M. and Weinshenker B. G. (2000) Multiple sclerosis. *New Engl. J. Med.* **343**, 938–952.
- Olson J. K. and Girvin A. M. and Miller S. D. (2001) Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J. Virol.* **75**, 9780–9789.
- Ortat G., Ligresti A., de Petrocellis L., Morera E. and Di Marzo V. (2003) Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1475–1481.
- Pena-Rossi C., Delcroix M., Huitinga I., McAllister A., Van Rooijen N., Claassen E. and Brahic M. (1997) Role of macrophages during Theiler's virus infection. *J. Virol.* **71**, 3336–3340.
- Pope J. G., Karpus W. J., Vanderlugt C. L. and Miller S. D. (1996) Flow cytometric and functional analysis of CNS-infiltrating cells in SJL/J mice with Theiler's virus-induced demyelinating disease: evidence for CD4 T cell-mediated pathology. *J. Immunol.* **156**, 4050–4058.
- Pryce G., Ahmed Z., Hankey D. J. R. *et al.* (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* **126**, 2191–2202.
- Puffenbarger R. A., Boothe A. C. and Cabral G. A. (2000) Cannabinoids inhibit LPS-inducible cytokine mRNA expression in rat microglial cells. *Glia* **29**, 58–69.
- Stefano G. B., Liu I. and Goligorsky M. S. (1996) Cannabinoid receptors are coupled to nitric oxide in invertebrate immunocytes, microglia, and human monocytes. *J. Biol. Chem.* **271**, 19 238–19 242.
- Wagner J. A., Varga K., Ellis E. F., Rzigalinski B. A., Martin B. R. and Kunos G. (1997) Activation of peripheral CB1 cannabinoid receptors in haemorrhagic shock. *Nature* **390**, 518–521.
- Waksman Y., Olson J. M., Carlisle S. J. and Cabral G. (1999) The central cannabinoid receptor 8CB1 mediates inhibition of nitric oxide production by rat microglial cells. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **288**, 1357–1366.
- Walter L. and Stella N. (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* **2**, 1–11.
- Walter L., Franklin A., Witting A., Wade C., Xie Y., Kunos G., Mackie K. and Stella N. (2003) Nonsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.* **23**, 1398–1405.
- Zajicek J., Fox P., Sanders H., Wright D., Vickery J., Nunn A. and Thompson A. (2003) Cannabinoids for treatment of spasticity and other symptoms related to multiple sclerosis (CAMSstudy): multicentre randomised placebo-control trial. *Lancet* **362**, 1517–1526.
- Zheng I., Calenoff M. A. and Dal Canto M. C. (2001) Astrocytes and microglia are the main cells responsible for viral persistence in Theiler's virus encephalomyelitis infection leading to demyelination. *J. Neuroimmunol.* **118**, 256–267.

# Activation of cannabinoid CB<sub>2</sub> receptor negatively regulates IL-12p40 production in murine macrophages: role of IL-10 and ERK1/2 kinase signaling

<sup>1,2</sup>Fernando Correa, <sup>1</sup>Leyre Mestre, <sup>1</sup>Fabian Docagne & <sup>\*,1</sup>Carmen Guaza

<sup>1</sup>Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC Avda Dr Arce 37, 28002, Madrid, Spain

**1** Cannabinoid (CB) receptor agonists have potential utility as anti-inflammatory drugs for the treatment of many disease conditions. In the present study, we investigated the effects of the synthetic CB<sub>2</sub> ligand, JWH-133 on the production of interleukins (ILs), IL-12 and IL-10 by lipopolysaccharide (LPS) or Theiler's virus (TMEV)-activated macrophages.

**2** JWH-133 evoked a concentration-related inhibition (10 nM–5 μM) of LPS/IFN-γ induced IL-12p40 release. The effect of JWH-133 (100 nM) was significantly blocked by the CB<sub>2</sub> antagonist SR-144528 (1 μM). Macrophages infected with TMEV increased IL-12p40 production and activation of CB<sub>2</sub> receptors by JWH-133 (100 nM) inhibited it.

**3** The inhibitory effect of JWH-133 (100 nM) on IL-12p40 production may involve extracellular-regulated kinase (ERK1/2) signaling: (i) JWH-133 induced a greater and sustained activation of ERK1/2 kinase in comparison with the level of activation observed following LPS; (ii) the inhibition of ERK1/2 by the specific inhibitor PD98059 increased LPS-induced IL-12p40 production in the presence or absence of JWH-133 suggesting a negative regulation of ERK pathway on IL-12p40 biosynthesis.

**4** Activation of CB<sub>2</sub> receptors by JWH-133 (10 nM–5 μM) enhanced IL-10 release by LPS/IFN-γ-activated macrophages and addition of SR144558 (1 μM) totally blocked the effect of JWH (100 nM).

**5** Inhibition of ERK by PD98059 significantly suppressed IL-10 production by LPS-activated macrophages. Endogenous IL-10 plays a modulatory role in IL-12 production. Blocking IL-10 with neutralizing antibody resulted in increased IL-12p40 secretion by LPS-activated macrophages in the absence or presence of JWH-133. In contrast, the addition of exogenous mIL-10 reduced the secretion of IL-12p40 in response to LPS.

*British Journal of Pharmacology* (2005) **145**, 441–448. doi:10.1038/sj.bjp.0706215

Published online 11 April 2005

**Keywords:** Cannabinoids; CB<sub>2</sub> receptors; IL-12p40; IL-10; ERK1/2; macrophages

**Abbreviations:** APCs, antigen presenting cells; CBs, cannabinoids; CB<sub>1</sub> receptor, type I CB receptor; CB<sub>2</sub> receptor, type 2 CB receptor; DTH, delayed-type hypersensitivity; ERK, extracellular signal-regulated kinase; FBS, fetal bovine serum; IFN-γ, interferon-gamma; IL-10, interleukin-10; IL-12, interleukin-12; LPS, lipopolysaccharide; MAP kinase, mitogen-activated protein kinase; MHC, major histocompatibility complex; MS, multiple sclerosis; MOI, multiplicity of infection; THC, tetrahydrocannabinol; Th1, T helper 1; Th2, T helper 2; TMEV, Theiler's virus; TMEV-IDD, Theiler's virus induced demyelinating disease

## Introduction

The effects of both synthetic and endogenous cannabinoids (CBs) upon the immune system have acquired a great interest during the last years, because of their possible usefulness in chronic immune inflammatory diseases. However, the role of CB receptors and the molecular mechanisms involved in the modulation of immune reactivity by CBs remain unclear. Two CB G protein-coupled receptors have been cloned until now, CB<sub>1</sub> receptors (Matsuda *et al.*, 1990) expressed primarily by neurons, and CB<sub>2</sub> receptors (Munro *et al.*, 1993) expressed primarily by immune cells. Besides, there is evidence supporting the presence of yet uncloned CB receptors mainly on the basis of pharmacological activity of CBs in CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>

receptor-deficient mice (Jarai *et al.*, 1999; Di Marzo *et al.*, 2000; Breivogel *et al.*, 2001). In addition, two endocannabinoid ligands have been identified and characterized: anandamide (Devane *et al.*, 1992) and 2-arachidonoylglycerol (2-AG) (Mechoulam *et al.*, 1995; Sugiura *et al.*, 1995). Another recently identified endocannabinoid includes *N*-arachidonoyl-dopamine (NADA), which binds to the vanilloid subfamily member 1 (TRPV1) and CB<sub>1</sub> receptor and which shows anti-inflammatory and immunosuppressive activities (Sancho *et al.*, 2004).

Macrophages are activated early in response to immune challenge and are major players in both innate and adaptive immunity. The finding that a CB<sub>2</sub> synthetic agonist elicited benefits in a viral model of multiple sclerosis (MS), in terms of motor improvement, down-inflammation and remyelination (Arévalo-Martín *et al.*, 2003), prompted us to investigate the immunomodulatory actions of the synthetic CB<sub>2</sub> ligand,

\*Author for correspondence; E-mail: cgjb@cajal.csic.es

<sup>2</sup>Supported by a Fellowship from the Fundación Carolina.

Published online 11 April 2005

JWH-133 in bacterial endotoxin (LPS) or Theiler's virus (TMEV)-activated macrophages. IL-12 is a heterodimeric cytokine composed of two disulfide-linked glycosylated chains of 40 kDa (p40) and 35 kDa (p35) encoded by two distinct genes (Gubler *et al.*, 1991). IL-12 is produced primarily by monocytes, macrophages and dendritic cells in response to bacterial or intracellular pathogens (D'Andrea *et al.*, 1993) or upon interaction with activated T cells (Shu *et al.*, 1995). It also induces the development of Th1 responses and has an important role in maintaining the balance between Th1 and Th2 responses *in vivo* (Trinchieri, 2003). IL-12 has been implicated in the pathogenesis of infectious, inflammatory and autoimmune diseases such as MS. A relationship between cannabinoids and T-helper cell biasing has been established by several lines of evidence (Klein *et al.*, 2003). *In vivo* experiments showed that THC injection suppressed the development of Th1 cell-mediated immunity to *Legionella pneumophila* infection, with decreased IFN- $\gamma$  and IL-12 levels in the serum (Klein *et al.*, 2000). However, the cellular targets, the specific contribution of CB receptors and the molecular mechanisms involved in these effects remain unknown. Cells of the macrophage lineage seem to express CB<sub>1</sub> receptors at low level and, mainly CB<sub>2</sub> receptors (Carlisle *et al.*, 2002; Walter *et al.*, 2003). In this report, we show that JWH-133 inhibits IL-12p40 production and enhances IL-10 release by activated macrophages through a CB<sub>2</sub> receptor-mediated pathway. In this study, we also focused on the role of extracellular signal-regulated kinase (ERK1/2) in IL-12p40 and IL-10 regulation by the activation of CB<sub>2</sub> receptors. Finally, we suggest a contribution of endogenous IL-10 in mediating CB-induced downregulation of IL-12p40 production.

## Methods

### Animals

Balb/c and SJL/J mice, susceptible to TMEV-induced demyelination development (TMEV-IDD), from our in-house colony (Cajal Institute, Madrid, Spain) were used. Animals were housed in cages with filter tops in a laminar flow hood and maintained on food and water *ad libitum* in a 12-h dark–light cycle. Handling of animals was performed in compliance with the guidelines of animal care set by the European Union (86/609/EEC).

### Macrophage cultures

Peritoneal macrophages were harvested by peritoneal lavage with Hanks Balanced Salt Solution (HBSS; Gibco BRL, Life Tech. Ltd, Germany) 3 days after intraperitoneal (i.p.) injection of mice with 2 ml of 5% thioglycollate broth (Sigma, Spain). Cells were centrifuged at 800 r.p.m., 10 min at room temperature (RT) and resuspended in Gey's red cells lysis buffer. After 20 min of incubation at RT, cells were centrifuged and resuspended in fresh Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% inactivated fetal bovine serum (FBS, Gibco BRL, Life Tech. Ltd, Germany), 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin and 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin (Gibco BRL, Life Tech. Ltd, Germany). Cells were seeded in 12-well plates ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) and incubated overnight at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO<sub>2</sub>. At 1 h prior to

stimulation, nonadherent cells were removed by washing twice with DMEM and macrophages were resuspended in fresh culture medium supplemented with antibiotics and 5% FBS. At 5 min previous to LPS/IFN- $\gamma$  exposure, JWH-133 (10 nM, 100 nM, 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M) and the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor antagonists SR141716A and SR144528, respectively, were added at a dose of 1  $\mu$ M. LPS and IFN- $\gamma$  were diluted in DMEM, and added to each well at a final concentration of 50 ng ml<sup>-1</sup> and 100 U ml<sup>-1</sup>, respectively. JWH-133 stock solution was prepared in DMSO and aliquots (1 mM) were diluted in PBS and 1% DMSO. Control cells were cultured with the relevant amounts of DMSO. Cells stimulated were incubated 18 h at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub>. After this time, cells were harvested for protein measurement, and supernatants collected for cytokine determination. Trypan blue dye exclusion testing or the 3,4,5-dimethylthiazol 2-5-diphenyltetrazolium bromide thiazol blue test indicated that the cannabinoid-related compounds at the highest concentrations used (5  $\mu$ M) did not affect macrophage cell viability. In the experiments involving ERK 1/2 inhibition, cells were preincubated with the inhibitor of MEK1, PD98059 (10  $\mu$ M) for 30 min in the presence or absence of JWH-133 (100 nM), and then stimulated with LPS 50 ng ml<sup>-1</sup> for 18 h. In a set of experiments, murine neutralizing IL-10 antibody or exogenous murine IL-10 (10 ng ml<sup>-1</sup> was added to macrophage cultures before LPS stimulation for 18 h in order to collect cell supernatants to measure IL-12p40.

### Murine macrophage cell line RAW 264.7

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was purchased from Center of Biological Sciences (CIB, CSIC, Madrid, Spain). Low passage number cells were grown in DMEM medium supplemented with 2 mM glutamine, 100 U ml<sup>-1</sup> penicillin, 100  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> streptomycin and 10% FBS.

### Infection of macrophage cultures

The Daniel's (DA) strain of TMEV was plaque purified on BHK-21 cells, and the virus titers were determined by standard plaque assay on BHK-21 cells. Cell cultures were infected with the DA strain of TMEV at a multiplicity of infection (MOI) of 5-plaque format units (PFU) per cell. Cell cultures were washed twice to remove serum components and 0.25 ml of appropriately diluted virus stock solution was added to each well. After adsorption of the virus for 2 h at 37°C cells, we added 0.75 ml of new medium containing only 2% FBS. The supernatants from infected and noninfected cultures were collected in parallel after 24 h postinfection for cytokines determination.

### Western blot analysis

Cells were lysed in 200  $\mu$ l of Tris-buffered saline (TBS) pH 7.6 containing 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF), 50  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> leupeptin, 10  $\mu$ g ml<sup>-1</sup> aprotinin, 5 mM benzamidine, 1 mM sodium orthovanadate, 2 mM NaF and 5 mM DTT. Whole-cell lysates were mixed with 5  $\times$  Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Equal amounts of protein (30  $\mu$ g) were resolved in 10% SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and electroblotted to nitrocellulose at 4°C. The membrane blots

were blocked for 1 h with 5% dry milk in TBS containing 0.1% Tween-20 and then incubated with primary antibodies, at a dilution of 1:1000 (phosphospecific and total ERK1/2 from New England Biolabs, Beverly, MA, U.S.A.). Then, the blots were incubated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies and visualized by chemiluminescence using an ECL Western Blotting Detection Kit (Amersham Pharmacia Biotech). The blots were stripped using a 2% SDS and 0.7%  $\beta$ -mercaptoethanol solution in 62.5 mM Tris buffer, pH 6.8 and reprobed.

#### Measurement of IL-10 and IL-12p40 production by ELISA

IL-10 content in macrophage culture supernatants was measured by solid phase sandwich ELISA, using a monoclonal antibody specific for mIL-10 (Diaclon, CA, U.S.A.). The minimum detectable dose of mIL-10 was less than 7 pg ml<sup>-1</sup> and the intra- and inter-coefficient of variation were 4.4 ± 0.5% and 8.9 ± 0.9% respectively. Levels of IL-12p40 in macrophage supernatants were quantified using specific ELISA kits purchased from Biosource Int (CA, U.S.A.), according to the manufacturer's instructions. The assay detected >2 pg ml<sup>-1</sup> and the intra- and inter-assay coefficients of variations were between 3.3–4.5 and 5.6–6.4%, respectively.

#### Drugs

LPS was from *Escherichia coli* (Serotype 026:B6, Sigma, Spain), IFN- $\gamma$  was from PeproTech (London U.K.). JWH-133 was purchased from Tocris Cookson Ltd (U.K.). SR141716A (*N*-piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-3-pyrazol-carboxamide and SR144528 (*N*-[1*S*]-endo-1,3,3-trimethylbicyclo [2.2.1]heptan-2-yl-5-(4-chloro-3-methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide) were a gift from Sanofi Recherche (Montpellier, France). The MEK inhibitor PD98059 was obtained from New England Biolabs (Beverly, MA, U.S.A.). Neutralizing mAb to IL-10 and murine IL-10 were from Genzyme (Cambridge, U.K.).

#### Statistics

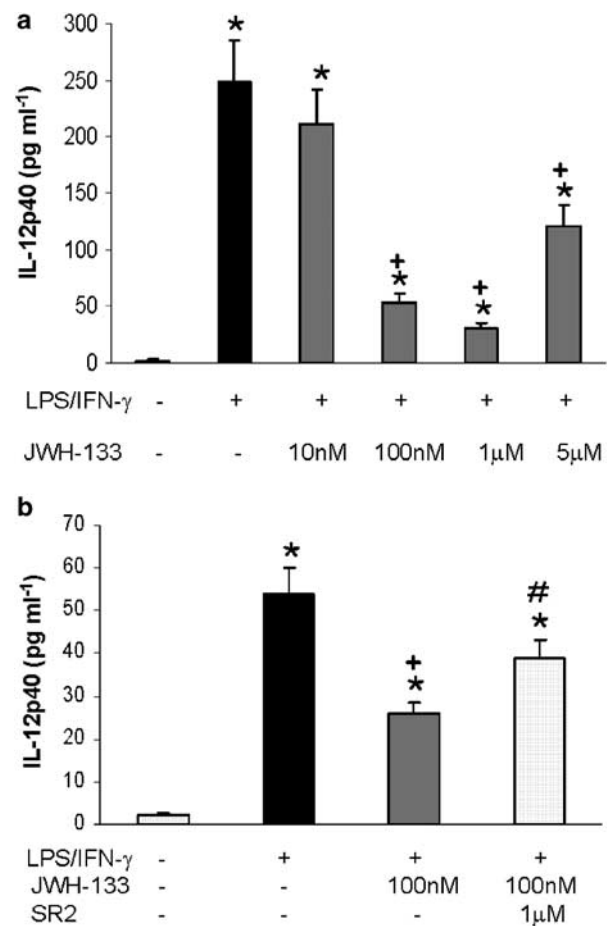
Results are presented as means ± s.e.m. of at least three experiments performed with different cell preparations. Analysis of variance followed by the Tukey test for multiple comparison were used to determine statistical significance (95%;  $P < 0.05$ ).

## Results

#### Effects of the activation of CB<sub>2</sub> receptors by the agonist JWH-133 on the production of IL-12p40 by activated macrophages

THC administration in mice subjected to immunological challenge has been shown to drive a reduction in Th1 immunity. This process has been suggested to be induced by downregulation of IL-12 through activation of both CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors (Klein *et al.*, 2000). IL-12 is a cytokine primarily produced by monocytes and macrophages, and plays an essential role in the development of cell-mediated immunity.

Bioactive IL-12 (IL-12p70) is a heterodimer formed by p35 and p40 subunit, and here, we examined the effect of JWH-133 on the production of IL-12 subunit p40, which is secreted by LPS/IFN- $\gamma$  stimulated macrophages. To evaluate this, we measured IL-12p40 levels in the supernatants of LPS/IFN- $\gamma$  stimulated macrophage cultures in the presence or absence of the selective CB<sub>2</sub> agonist JWH-133. Cells were preincubated with different doses of JWH-133 or vehicle for 5 min, before activation with LPS/IFN- $\gamma$  for 18 h, and tested for IL-12p40 levels in cell supernatants. JWH-133 inhibited LPS/IFN- $\gamma$  induced IL-12 production in a dose-dependent manner (Figure 1a), but the higher dose used (5  $\mu$ M) was less effective than the dose of 100 nM, suggesting an inverted U-shaped dose effect. In Figure 1b it is shown that the effect of JWH-133 (100 nM) on IL-12 production was significantly blocked by the



**Figure 1** JWH-133 inhibits LPS-induced IL-12 p40 production by murine macrophages. (a) Macrophages ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with JWH-133 at concentrations ranging from 0 to 5  $\mu$ M for 5 min before LPS (50 ng ml<sup>-1</sup>)/IFN- $\gamma$  (100 U ml<sup>-1</sup>) stimulation for 18 h following which cell supernatants were harvested and analyzed for IL-12p40 production. The results shown are the mean ± s.e.m. of three independent experiments in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control; + $P < 0.001$  vs LPS/IFN- $\gamma$ . (b) Macrophages were pretreated with the CB<sub>2</sub> antagonist SR144558 for 30 min before CB<sub>2</sub> activation with JWH-133 (100 nM) and then subjected to LPS (50 ng ml<sup>-1</sup>)/IFN- $\gamma$  (100 U ml<sup>-1</sup>) stimulation for 18 h, following which supernatants were collected and analyzed for IL-12p40 production. The results shown are the mean ± s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control; + $P < 0.001$  vs LPS/IFN- $\gamma$ ; # $P < 0.01$  vs LPS/IFN- $\gamma$  plus JWH-133.

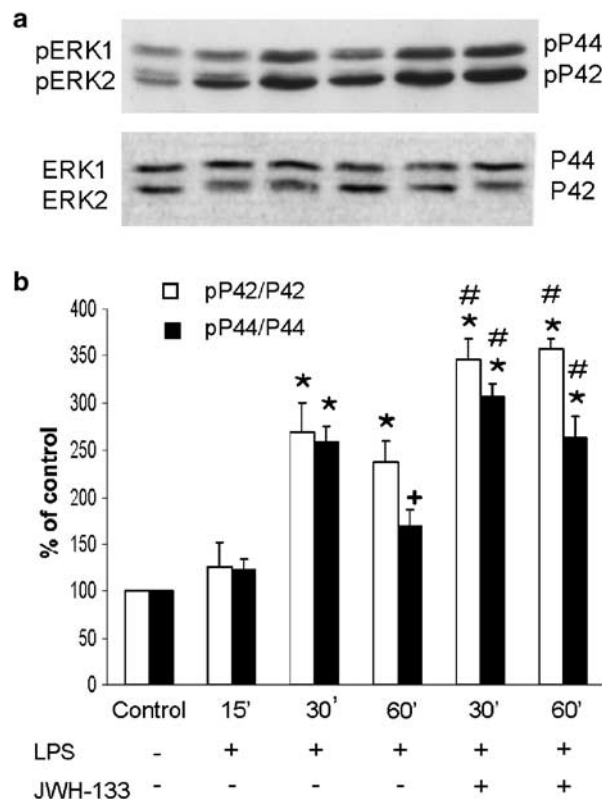
CB<sub>2</sub> antagonist SR144528 (Figure 1b), while the addition of the CB<sub>1</sub> antagonist SR141716A did not modify IL-12 levels (data not shown). In all cases, the results obtained using the two CB antagonists alone in normal or activated macrophages were not significantly different from those obtained in the absence of antagonists. Interestingly, the infection of macrophages from SJL/J mice with TMEV also elicited the biosynthesis of IL-12p40 (non-infected: non detectable; TMEV:  $119.20 \pm 12.3$  pg ml<sup>-1</sup>;  $P < 0.001$ ), and the treatment with the CB<sub>2</sub> agonist, JWH-133 (100 nM) significantly reduced its release to cell medium culture (TMEV:  $130.1 \pm 10.6$  pg ml<sup>-1</sup>; TMEV + JWH-133:  $23.66 \pm 4.8$  pg ml<sup>-1</sup>;  $P < 0.001$ ). This effect was also significantly antagonized by the CB<sub>2</sub> antagonist SR144528 (IL-12 levels:  $77.5 \pm 8.1$  pg ml<sup>-1</sup>;  $P < 0.001$ ).

#### *ERK1/2 activation is associated with JWH-133-mediated IL-12p40 inhibition by LPS-activated macrophages*

The molecular mechanisms underlying regulation of IL-12 production in macrophages are not fully understood. It has been suggested that MAPKs regulate IL-12 production in APC cells (Feng *et al.*, 1999; Utsugi *et al.*, 2003). To elucidate the mechanisms involved in the effects of JWH-133 on IL-12p40 production by LPS-stimulated murine macrophage cell line (RAW 264.7), we assessed the activation state of ERK1/2, after LPS treatment in the absence or presence of JWH-133. As expected, the level of phosphorylated ERK 1/2 was significantly increased by LPS, with a peak at 30 min, whereas at 60 min it showed a tendency to diminish (Figure 2a). The treatment with JWH-133 significantly enhanced the levels of phosphorylated ERK1/2 at 30 min in comparison with those obtained after LPS alone and this significant activation was maintained at 60 min (Figure 2b). This sustained activation of ERK1/2 may be involved in the decreased production of IL-12p40 accordingly to results showing that ERK activation negatively regulates the production of IL-12p40 in activated APC cells (Yanagawa *et al.*, 2002). Therefore, the increased and sustained ERK1/2 following JWH-133 treatment may be, in part, responsible for the inhibition of IL-12p40 in LPS-activated macrophages. To confirm the role of ERK1/2 MAP kinases, we analyzed IL-12p40 production in LPS-stimulated macrophages treated with the specific inhibitor of MEK, PD98059. The pharmacological inhibition of ERK1/2 MAP kinase by PD98059 (10  $\mu$ M) significantly enhanced the production of IL-12p40 by LPS-stimulated macrophages in the absence or presence of JWH-133 (Figure 3). These data point to ERK1/2 MAP kinase as a possible mediator of the inhibitory action of CB<sub>2</sub> activation on IL-12p40 production.

#### *Effects of the activation of CB<sub>2</sub> receptors by the agonist JWH-133 on the production of IL-10 by activated macrophages. Role of ERK1/2*

In mouse models of endotoxemia, it has been reported that CBs exert modulatory effects on cytokine responses, including the anti-inflammatory cytokine IL-10 (Smith *et al.*, 2000) and suggested a role for the CB<sub>1</sub> receptor in this modulation. Thus, to study whether activation of CB<sub>2</sub> receptor affects IL-10 production by LPS/IFN- $\gamma$ -activated macrophages, we performed a set of experiments in the presence or absence of JWH-133. In Figure 4a, it is shown that after treatment with LPS/IFN- $\gamma$ , IL-10 production was increased in murine

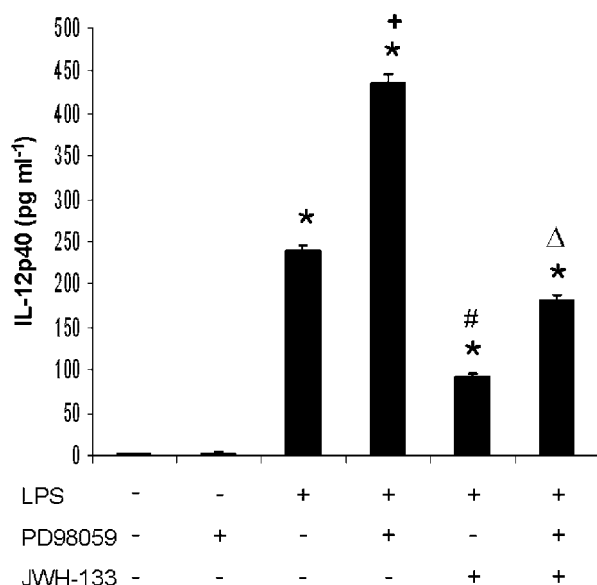


**Figure 2** Time course of ERK1/2 activation by LPS in presence or absence of JWH-133 (100 nM). Macrophage cell line RAW 264.7 cultures ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated or not with JWH-133 (100 nM) 5 min before LPS ( $1 \mu$ g ml<sup>-1</sup>) stimulation for 30 and 60 min. (a) Whole-cell lysates (proteins 30  $\mu$ g) were prepared and subjected to SDS-PAGE followed by Western blot analysis using antiphospho-ERK1/2 kinase (dilution 1 : 1000) as described in Methods. To control for equal loading, membranes were stripped and reprobed with antibody recognizing total ERK1/2 kinase (dilution 1 : 1000). The experiments were repeated at least three times with similar results. Bands were visualized by the ECL method. It is shown as a representative Western blot. (b) Densitometric analysis showing the means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments of pP42/p42 and pP44/p44 band densities. \* $P < 0.001$  vs control; +  $P < 0.02$  vs control; # $P < 0.001$  vs LPS (30 and 60 min).

macrophages, and that JWH-133 at doses of 100 nM, 1  $\mu$ M and 5  $\mu$ M significantly enhanced the release of IL-10 as indicated by the levels of this cytokine in cell supernatants. In addition, by using the CB<sub>2</sub> antagonist SR144528, we confirmed the involvement of CB<sub>2</sub> receptors in the modulatory action of JWH-133 on IL-10 production (Figure 4b), as the pretreatment with SR144528 completely abolished the enhancement of IL-10 release induced by JWH-133 at the dose of 100 nM. To determine whether inhibition of ERK1/2 is also effective in modifying IL-10 responses to LPS, we used the specific inhibitor PD98059 (10  $\mu$ M). The inhibitor added to LPS-activated macrophages significantly decreased IL-10 production in the presence or absence of JWH-133, when compared with their corresponding controls (Figure 5).

#### *Endogenous IL-10 is involved in the suppressive effect of JWH-133 on the production of IL-12p40 by activated macrophages*

Since IL-10 is a potent biological inhibitor of IL-12 synthesis by activated macrophages (D'Andrea *et al.*, 1993), we assessed

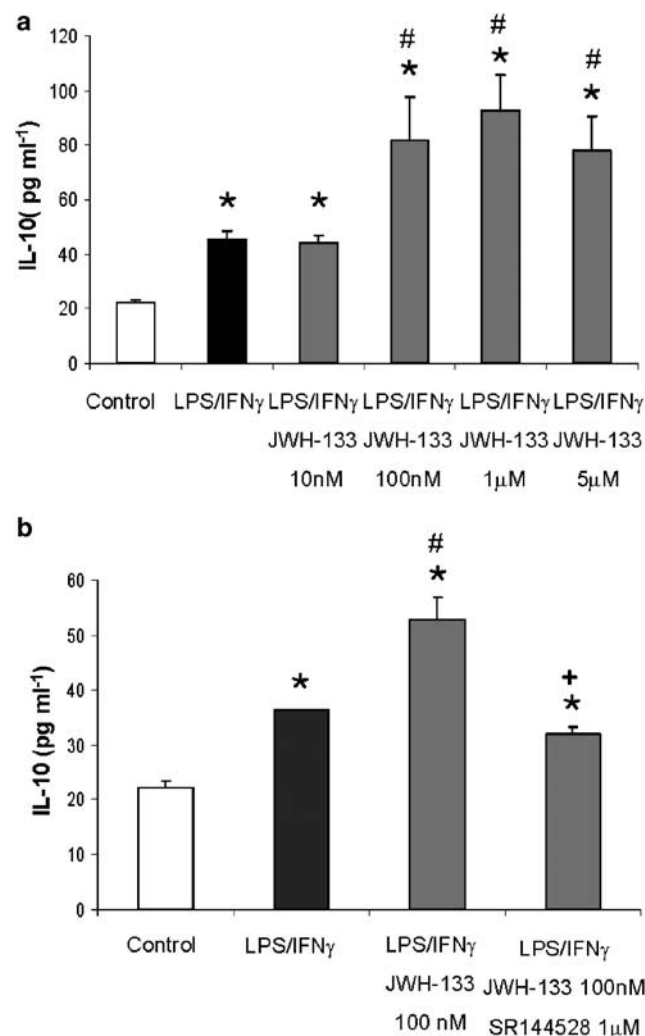


**Figure 3** Increased production of IL-12 after inhibition of ERK1/2 signaling. Murine macrophages ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with PD98059 ( $10 \mu\text{M}$ ) 1 h before LPS ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ), in the absence or presence of JWH-133 ( $100 \text{ nM}$ ) and the supernatants were harvested after 24 h and analyzed by ELISA for IL-12p40 production. The results shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control; + $P < 0.001$  vs LPS; # $P < 0.001$  vs LPS;  $\Delta P < 0.01$  vs LPS + JWH-133.

whether stimulated endogenous synthesis of IL-10 by JWH-133 may contribute to the observed decreases on IL-12p40. To this end, we examined the effects of the addition of IL-10 neutralizing antibody (mIL-10Ab) to stimulated macrophages in order to avoid negative feedback regulation of IL-12p40. The results showed that mIL-10Ab resulted in a higher production of IL-12p40 in comparison with the levels obtained in cells stimulated with LPS alone (Figure 6). Indeed, the addition of exogenous murine IL-10 ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ) exerted the opposite effect by blocking IL-12p40 secretion in a significant manner ( $P < 0.001$ ; Figure 6). Following the activation of CB<sub>2</sub> receptors by JWH-133, the blockade of endogenous IL-10 induced a significantly ( $P < 0.001$ ) diminished response to the CB, consistent with the proposed regulatory role of IL-10 upon IL-12p40 synthesis. By contrast, the addition of murine IL-10 ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ) increased the degree of IL-12p40 inhibition evoked by JWH-133 ( $P < 0.001$ ). Therefore, these data strongly suggested that the increase in IL-10 production induced by JWH-133 contributed to the downregulation of IL-12p40 biosynthesis.

## Discussion

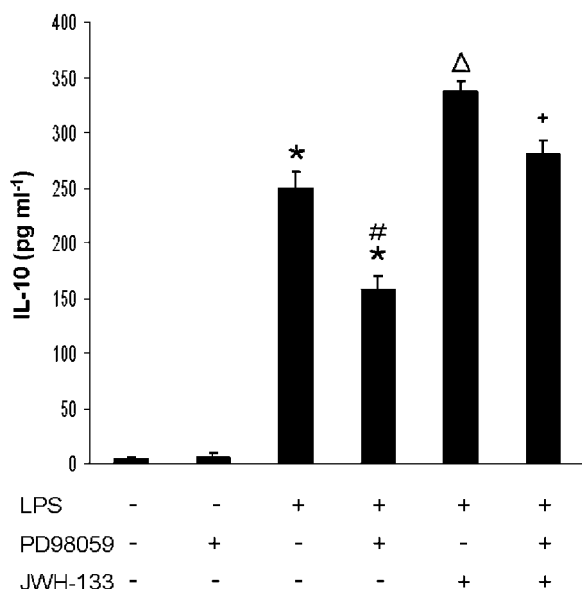
CB receptor agonists have potential utility as anti-inflammatory drugs for the treatment of many disease conditions. We have previously shown the efficacy of the CB<sub>2</sub> agonist JWH-015 in diminishing macrophage/microglia reactivity and inducing recovery of motor function in a viral (TMEV) model of MS (Arévalo-Martín *et al.*, 2003). These effects may be justified based on the influence of CBs on the motor pathways together with their immunomodulatory activity. Although numerous reports indicate that CBs alter the functional



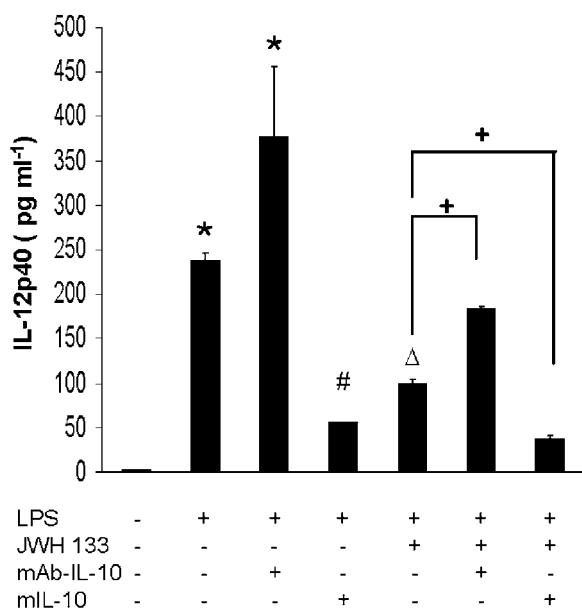
**Figure 4** JWH-133 enhances LPS-induced IL-10 production by murine macrophages. (a) Macrophages ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with JWH-133 at concentrations ranging from 0 to  $5 \mu\text{M}$  for 30 min before LPS ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ )/IFN- $\gamma$  ( $100 \text{ U ml}^{-1}$ ) stimulation for 18 h, following which cell supernatants were harvested and analyzed for IL-10 production. The results shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.001$  vs LPS/IFN- $\gamma$ . (b) Macrophages were pretreated with the CB<sub>2</sub> antagonist SR144528, prior CB<sub>2</sub> activation with JWH-133 ( $100 \text{ nM}$ ) and then subjected to LPS stimulation for 18 h, following which supernatants were collected and analyzed for IL-10 production. The results shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent performed experiments in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.01$  vs LPS/IFN- $\gamma$ ; + $P < 0.001$  vs LPS/IFN- $\gamma$  + JWH-133.

activities of immune cells (Berdyshev, 2000; Klein *et al.*, 2003), the cellular basis for these CB actions remain unclear. The results presented in this study show that the activation of CB<sub>2</sub> receptors by JWH-133 evoked a concentration-related inhibition of LPS/IFN- $\gamma$ -induced IL-12p40 release from murine macrophages. IL-12p40 inhibition by JWH-133 ( $100 \text{ nM}$ ) was significantly antagonized by SR144528, confirming the involvement of CB<sub>2</sub> receptors. Other groups have reported that THC inhibited the production of IL-12, as detected in serum of mice subjected to *L. pneumoniae* infection, but this effect appeared to involve both type of receptors, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptors (Klein *et al.*, 2000). Later studies using





**Figure 5** Decreased production of IL-10 after inhibition of ERK1/2 signaling. Murine macrophages ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with PD98059 ( $10 \mu\text{M}$ ) 1 h before LPS ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ), in the absence or presence of JWH-133 ( $100 \text{ nM}$ ) and the supernatants were harvested after 24 h and analyzed by ELISA for IL-10 production. The results shown are the mean  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. Statistics: \* $P < 0.001$  vs control;  $^{\Delta}P < 0.001$  vs LPS; # $P < 0.001$  vs LPS; + $P < 0.001$  vs LPS + JWH-133.



**Figure 6** Endogenous IL-10 inhibits IL-12p40 production by stimulated macrophages. Murine macrophages ( $0.5 \times 10^6$  cells/well) were pretreated with neutralizing antibody (mAb-IL-10) or added exogenous murine IL-10 ( $10 \text{ ng ml}^{-1}$ ) before LPS ( $50 \text{ ng ml}^{-1}$ ) activation and supernatants were collected after 24 h for assessing IL-12p40 release. Results are the means  $\pm$  s.e.m. of three independent experiments performed in triplicate. \* $P < 0.001$  vs control; # $P < 0.001$  vs LPS;  $^{\Delta}P < 0.02$  vs LPS; + $P < 0.05$  vs LPS + JWH-133.

activated peripheral blood T-cell cultures showed that treatment with THC inhibited cell proliferation and the generation of Th1 cytokines, including IL-12, by CB<sub>2</sub>-mediated mechanisms (Yuan *et al.*, 2002). IL-12 plays a central role as a link

between the innate and adaptive immunity, and polarizes the immune system toward a Th-1 response required for protection against intracellular microorganisms. The role of IL-12 in the protective and pathological processes during viral infections depends on the type of virus, but macrophages from susceptible strain of mice (SJL/J), which develop demyelinating disease after TMEV infection (TMEV-IDD), showed increased levels of IL-12p40 when infected with the virus. Under these conditions, the application of JWH-133 abolishes the generation of IL-12 by TMEV-infected macrophages. This is of special interest in TMEV-IDD, since infiltrating macrophages and microglia are the viral reservoir and constitute the main APCs in the CNS (Martinat *et al.*, 2002). IL-12 is critical for the induction of clonal expansion and differentiation of TMEV-specific MHC class II-restricted effector delayed-type hypersensitivity DTH (Th1) cells (Pope *et al.*, 1998; Olson *et al.*, 2001). Therefore, blunting IL-12 production by macrophages following activation of CB<sub>2</sub> receptors may have important implications for the pathogenesis of TMEV-IDD. In this regard, previous studies demonstrated that treatment with anti-IL-12 shifted Th1–Th2 balance to Th2 dominance and led to a significant attenuation of symptomatology and demyelination in TMEV-infected mice (Inoue *et al.*, 1998).

The results of our study also showed that ERK1/2 MAP kinases play a negative regulatory role in the production of IL-12p40 by LPS-stimulated macrophages. The MEK 1 inhibitor that selectively targets the ERK MAP kinase signaling cascade promoted IL-12p40 production, a finding consistent with earlier reports (Wittmann *et al.*, 2002; Yanagawa *et al.*, 2002; Tang *et al.*, 2004). Moreover, activation of CB<sub>2</sub> receptors by JWH-133 induced a greater and sustained activation of ERK1/2 MAP kinase for up to at least 60 min, perhaps contributing to the downregulation of IL-12p40. In addition, we find that JWH-133 enhanced the release of IL-10 by LPS/IFN- $\gamma$ -stimulated macrophages and this effect was blocked by the CB<sub>2</sub> antagonist SR144558. Since inhibition of ERK by PD98059 significantly suppressed IL-10 and exogenous IL-10 reversed the upregulated production of IL-12 induced by PD98059, it is suggested a unidirectional negative autocrine regulation of IL-12 by IL-10, as well as that activation of ERK involves the differential production of IL-10 and IL-12 by activated macrophages. Thus, the regulation of differential production of IL-10 and IL-12 may play an important role for macrophages in priming Th1 or Th2 in the immune responses. *In vivo* experiments have shown that other CB agonists, WIN 55212-2 and HU-210, decreased IL-12 and increased levels of IL-10 in the serum of LPS-treated mice through a CB<sub>1</sub> receptor action (Smith *et al.*, 2000). However, the mechanisms by which the CB agonists produced their modulatory effects on LPS-induced serum cytokines are unknown as well as the cellular source of these cytokines, since cytokine alterations may be secondary to changes in cellular targets other than immune cells. According to other studies (Yi *et al.*, 2002), our data show that endogenous IL-10 acts as a crucial factor for maintenance of the balance of appropriate macrophage responses to LPS by limiting the production of synthesis of IL-12. We also provided evidence that the negative regulation of IL-12 by endogenous IL-10 may be a relevant mechanism involved in the suppressive effect of JWH-133 upon IL-12 production. It is conceivable that the cytokine profile reported here in macrophages may occur during induction of an immune response as a consequence of

activation of CB<sub>2</sub> receptors. Direct effects of CB<sub>2</sub> agonists targeting macrophages revealed a reduction in the production of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  following activation with LPS/IFN- $\gamma$  (Klegeris *et al.*, 2003) and a decrease of neurotoxicity of culture supernatants. In addition, activation of CB<sub>2</sub> receptors also decreases the expression of MHC class II antigens by activated macrophages (unpublished results). The overall actions due to activation of CB<sub>2</sub> receptors in cells of macrophage lineage may prevent the generation of a Th-1 immune response affecting the required immunity to combat a particular pathogen or, alternatively, reduce inflammation/pathology associated with certain chronic disease states, such as MS.

In summary, the results of this study show that (i) activation of CB<sub>2</sub> receptors inhibits IL-12p40 production and enhances IL-10 biosynthesis by activated macrophages, (ii) JWH-133 may exert its inhibitory effect on IL-12p40 production by a

greater and sustained activation of ERK1/2 MAP kinase, (iii) pharmacological inhibition of ERK promotes IL-12p40 production and reduces IL-10 by activated macrophages, (iv) increased endogenous IL-10 secretion may also contribute to this inhibition by acting in an autocrine way. These results suggest that CB<sub>2</sub> agonists might be useful for chronic inflammatory diseases therapies. Additional research is being performed to establish the possible role of endocannabinoids in the regulation of immunity in normal and pathological conditions.

We gratefully appreciate Dr M. Rodriguez (Department of Immunology and Neurology, Mayo Clinic/Foundation, Rochester, MN, U.S.A.) for kindly providing Theiler's virus strain. This work was supported by grants from the MCYT (SAF-2001/1246 and SAF 2004-00416).

## References

- ARÉVALO-MARTÍN, A., VELA, J.M., MOLINA-HOLGADO, E., BORRELL, J. & GUAZA, C. (2003). Therapeutic actions of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.*, **23**, 2511–2516.
- BERDYSHEV, E.V. (2000). Cannabinoid receptors and the regulation of immune response. *Chem. Phys. Lipids*, **108**, 169–190.
- BREIVOGEL, C.S., GRIFFIN, G., DI MARZO, V. & MARTIN, B.R. (2001). Evidence for a new G protein-coupled cannabinoid receptor in mouse brain. *Mol. Pharmacol.*, **60**, 155–163.
- CARLISLE, S.J., MARCIANO-CABRAL, F., STAAB, A., LUDWICK, C. & CABRAL, C.A. (2002). Differential expression of the CB<sub>2</sub> cannabinoid receptor by rodent macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.*, **2**, 69–82.
- D'ANDREA, A.M., ASTE-AMEZAGA, N.M., VALIANTE, X., MA, M., KUBIN, M. & TRINCHEI, G. (1993). Interleukin-10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J. Exp. Med.*, **178**, 1041–1048.
- DEVANE, W.A., HANUS, L., BREUER, A., PERTWEE, R.G., STEVENSON, L.A., GRIFFIN, G., GIBSON, D., MANDELBAUM, A., ETINGER, A. & MECOULAM, R. (1992). Isolation and structure of a brain constituent that binds to the cannabinoid receptor. *Science*, **258**, 1946–1949.
- DI MARZO, V., BREIVOGEL, C.S., TAO, Q., BRIDGEN, D.T., RAZDAN, R.K., ZIMMER, A.M., ZIMMER, A. & MARTIN, B.R. (2000). Levels, metabolism, and pharmacological activity of anandamide in CB(1) cannabinoid receptor knockout mice: evidence for non-CB(1), non-CB(2) receptor-mediated actions of anandamide in mouse brain. *J. Neurochem.*, **75**, 2434–2444.
- FENG, G., GOODRIDGE, H.S., HARNETT, M.M., WEI, X., NIKOLAEV, A.V., HIGSON, A.P. & LIEW, F. (1999). Extracellular signal-related (ERK) and p38 mitogen-activated protein (MAP) kinases differentially regulate the lipopolysaccharide-mediated induction of inducible nitric oxide synthase and IL-12 in macrophages: Leishmania phosphoglycans subvert macrophages IL-12 production by targeting ERK MAP kinase. *J. Immunol.*, **163**, 6403–6412.
- GUBLER, U., CHUA, O., SCHOENHAUT, C., DWYER, M., MC COMAS, V., MOTIKA, R., NABAVI, N., WOLITZY, G., QUINN, P.M. & FAMILLETTI, P.C. (1991). Coexpression of two distinct genes is required to generate secrete bioactive cytotoxic lymphocyte maturation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **88**, 4143.
- INOUE, A., KOH, C., YAMAZAKI, M., YAHIOZAWA, H., ICHIKAWA, M., YAGITA, H. & KIM, B.S. (1998). Suppressive effect on Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease by the administration of anti-IL-12 antibody. *J. Immunol.*, **161**, 5586–5593.
- JARAI, Z., WAGNER, J.A., VARGA, K., LAKE, K.D., COMPTON, D.R., MARTIN, B.R., ZIMMER, A.M., BONNER, T.I., BUCKLEY, N.E., MEZEY, E., RAZDAN, R.K., ZIMMER, A. & KUNOS, G. (1999). Cannabinoid induced mesenteric vasodilation through an endothelial site distinct from CB1 or CB2 receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **96**, 14136–14141.
- KLEGERIS, A., BISSONNETTE, C.J. & MCGEER, P.L. (2003). Reduction of human monocyte neurotoxicity and cytokine secretion by ligands of the cannabinoid-type CB<sub>2</sub> receptor. *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 775–786.
- KLEIN, T.W., NEWTON, C., NAKACHI, N. & FRIEDMAN, H. (2000). Delta 9 tetrahydrocannabinol treatment suppresses immunity and early IFN-gamma, IL-12, and IL-12 receptor beta 2 responses to *Legionella pneumophila* infection. *J. Immunol.*, **164**, 6461–6466.
- KLEIN, T.W., NEWTON, C., LARSEN, K., LU, L., PERKINS, I., NONG, L. & FRIEDMAN, H. (2003). The cannabinoid system and immune modulation. *J. Leukocyte Biol.*, **74**, 486–496.
- MARTINAT, C., MENA, I. & BRAHIC, M. (2002). Theiler's virus infection of primary cultures of bone marrow-derived monocytes/macrophages. *J. Virol.*, **76**, 12823–12833.
- MATSUDA, L.A., LOLAIT, S.J., BROWNSTAIN, M.J., YOUNG, A.G. & BONNER, T.I. (1990). Structure of a cannabinoid receptor and functional expression of the cloned cDNA. *Nature*, **346**, 561–564.
- MECHOULAM, R., BEN-SHABAT, S., HANUS, L., LIGUMSKY, M., KAMINSKI, N.E., SCHATZ, A.R., GOPHER, A., ALMOG, S., MARTIN, B.R., COMPTON, D.R., PERTWEE, R.G., GRIFFIN, G., BAYEWITCH, M., BARG, M. & VOGEL, Z. (1995). Identification of an endogenous 2-monoglyceride, present in canine gut, that binds to cannabinoid receptors. *Biochem. Pharmacol.*, **50**, 83–90.
- MUNRO, S., THOMAS, K.L. & ABU-SHAAR, M. (1993). Molecular characterization of a peripheral receptor for cannabinoids. *Nature*, **365**, 61–65.
- OLSON, J.K., GIRVIN, A.M. & MILLER, S.D. (2001). Direct activation of innate and antigen presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus. *J. Virol.*, **75**, 9780–9789.
- POPE, J.G., VANDERLUGT, C.L., RAHBE, S.M., LIPTON, H.L. & MILLER, S.D. (1998). Characterization of and functional antigen presentation by central nervous system mononuclear cells from mice infected with Theiler's murine encephalomyelitis virus. *J. Virol.*, **72**, 7762–7771.
- SANCHO, R., MACHO, A., DE LA VEGA, L., CALZADO, M.A., FIEBICH, B.L., APPENDINO, G. & MUÑOZ, E. (2004). Immunosuppressive activity of endovanilloids: N-Arachidonoyl-dopamine inhibits activation of the NF- $\kappa$ B, NFAT, and activator protein 1 signaling pathways. *J. Immunol.*, **172**, 2341–2351.
- SHU, U., KINIWA, M., WU, Y., MALISZEWSKI, C., VEZZIO, N., HAKIMI, J., GATELY, M. & DELESPESE, G. (1995). Activated T cells induce IL-12 production by monocytes via CD40-CD40 ligand interactions. *Eur. J. Immunol.*, **25**, 1125–1128.
- SMITH, S.R., TERMINELLI, C. & DENHARDT, G. (2000). Effects of cannabinoid receptor agonist and antagonist ligands on production of inflammatory cytokines and anti-inflammatory interleukin-10 in endotoxemic mice. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **293**, 136–150.
- SUGIURA, T., KONDO, S., SUKAGAWA, A., NAKANE, S., SHINODA, A., ITOH, K., YAMASHITA, A. & WAKU, K. (1995). 2-Arachidonoyl-glycerol: a possible endogenous cannabinoid receptor ligand in brain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 89–97.

- TANG, N., LIMING, T., MCCORMICK, S., COOPER, D. & GHANNOUM, M. (2004). Inhibition of monocyte interleukin-12 production by *Candida albicans* via selective activation of ERK mitogen-activated protein kinase. *Infect. Immun.*, **72**, 2512–2513.
- TRINCHIERI, G. (2003). Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, **3**, 133–146.
- UTSUGI, M., DOBASHI, K., ISHIZUKA, T., ENDOU, K., HAMURO, J., MURATA, Y., NAKAZAWA, T. & MORI, M. (2003). C-Jun N-terminal kinases negatively regulates lipopolysaccharide-induced IL-12 production in human macrophages: role of mitogen-activated protein kinase in glutathione redox regulation of IL-12 production. *J. Immunol.*, **171**, 628–635.
- WALTER, L., FRANKLIN, A., WITTING, A., WADE, C., XIE, Y., KUNOS, G., MACKIE, K. & STELLA, N. (2003). Nonsychotropic cannabinoid receptors regulate microglial cell migration. *J. Neurosci.*, **23**, 1398–1405.
- WITTMANN, M., KIENLIN, P., MOMMERT, S., KAPP, A. & WERFEL, T. (2002). Suppression of IL-12 production by soluble CD40 ligand: evidence for involvement of the p42/44 mitogen-activated protein kinase pathway. *J. Immunol.*, **168**, 3793–3880.
- YANAGAWA, Y., IJIMA, K., IWABUCHI, K. & ONOÉ, K. (2002). Activation of extracellular signal-related kinase by TNF- $\alpha$  controls the maturation and function of murine dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.*, **71**, 125–132.
- YUAN, M., KIERTSCHER, S.M., CHENG, Q., ZOUMALAN, R., TASHKIN, D.P. & ROTH, M.D. (2002). Delta 9 tetrahydrocannabinol regulates Th1/Th2 cytokine balance in activated human T cells. *J. Neuroimmunol.*, **133**, 124–131.
- YI, A.K., YOON, J.G., YEO, S.J., HONG, S.G., ENGLISH, B.K. & KRIEG, A.M. (2002). Role of mitogen-activated protein kinases in CpG DNA-mediated IL-10 and IL-12 production: central role of extracellular signal-regulated kinase in the negative feedback loop of the CpG DNA-mediated Th1 response. *J. Immunol.*, **168**, 4711–4720.

(Received November 18, 2004

Revised January 14, 2005

Accepted February 24, 2005)

*The FASEB Journal* express article 10.1096/fj.04-2464fje. Published online June 7, 2005.

## Activation of the endocannabinoid system as a therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis

Silvia Ortega-Gutiérrez,<sup>\*,†</sup> Eduardo Molina-Holgado,<sup>‡</sup> Ángel Arévalo-Martín,<sup>‡</sup> Fernando Correa,<sup>\*</sup> Alma Viso,<sup>¶</sup> María L. López-Rodríguez,<sup>†</sup> Vincenzo Di Marzo,<sup>§</sup> and Carmen Guaza<sup>\*</sup>

<sup>\*</sup>Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC, 28002 Madrid, Spain; <sup>†</sup>Departamento de Química Orgánica I, Universidad Complutense, 28040 Madrid, Spain; <sup>‡</sup>Neuroinflammation Group, Hospital Nacional de Paraplégicos, Toledo, Spain; <sup>¶</sup>Instituto de Química Orgánica General, CSIC, 28006 Madrid, Spain; <sup>§</sup>Istituto di Chimica Biomolecolare, Consiglio Nazionale delle Ricerche, Via Campi Flegrei 34, 80078 Pozzuoli (NA), Italy

Corresponding author: Carmen Guaza, Neuroimmunology Group, Neural Plasticity Department, Cajal Institute, CSIC, 28002 Madrid, Spain. E-mail: cgjb@cajal.csic.es

### ABSTRACT

Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD) is a well-characterized murine model of human multiple sclerosis (MS) that closely resembles the chronic and progressive clinical form of the disease. Recent studies have described the involvement of the cannabinoid system in the progression of the disease and the benefits associated with the administration of cannabinoid agonists. With the objective to study whether "indirect" agonists, that is, compounds able to reinforce the physiological endocannabinoid transmission and, therefore, devoid of the psychotropic effects of "direct" agonists, could be suitable agents for the amelioration of MS neurological deficits, we administered the potent and selective anandamide uptake inhibitor UCM707 to TMEV-infected mice. Our results indicate that treatment during established disease significantly improves the motor function of the diseased mice. At the histological level, UCM707 is able to reduce microglial activation, diminish major histocompatibility complex class II antigen expression, and decrease cellular infiltrates in the spinal cord. Additionally, in microglial cells, UCM707 decreases the production of the proinflammatory cytokines tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6; reduces nitric oxide levels and inducible nitric oxide synthase expression; and is able to potentiate the action of a subeffective dose of the endocannabinoid anandamide. Overall, these results suggest that agents able to activate the endocannabinoid system could constitute a new series of drugs for the treatment of MS.

Key words: Theiler's virus • anandamide • microglia • MS • UCM707

**M**ultiple sclerosis (MS) is a human chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by autoimmune responses against myelin proteins that eventually impair the normal neurotransmission leading to sensory deficits and deteriorated motor coordination. Myelin destruction is considered to be the direct consequence of

the autoimmune response mediated by specific CD4<sup>+</sup> Th1 cells against myelin epitopes, although the generation of a chronic proinflammatory environment is thought to be of great importance for the impairment of the remyelination process (1).

Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease (TMEV-IDD) is a well-characterized murine model of human MS, which closely resembles the chronic and progressive clinical form of the disease (2). Infected mice exhibit several clinical deficits such as progressive impaired motor coordination, incontinence, and paralysis associated with axonal loss and electrophysiological abnormalities (3).

In spite of it being the most common human primary demyelinating disease of the CNS, there is no satisfactory treatment as yet for MS (4, 5), and there is a clear need for the development of agents able to treat this progressive disorder. Within this search, the endogenous cannabinoid system (ECS) has arisen as a promising new therapeutic target for the treatment of the disease. It has been described that cannabinoids, compounds active at the ECS, affect the pathogenesis of MS (6, 7). Several independent studies, performed in different animal models of MS, show that cannabinoids may impact the course of disease progression. In this context, synthetic cannabinoids are able to reduce spasticity and tremor in mice with chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (CREAE) (8). Also, in TMEV-infected mice, cannabinoid agonists induce recovery of motor function, diminish inflammation, and promote remyelination (9) by ameliorating the progression of clinical disease symptoms (10). These beneficial effects have been attributed to the activation of the ECS induced by the administration of cannabinoid agonists. In this regard, the ECS tonically controls spasticity in animal models of MS (11), exerts a direct effect on the motor neurotransmission pathways (12), diminishes the neuroinflammation (9, 13), and inhibits neurodegeneration (14).

However, the main drawback of a therapy based on cannabinoid "direct" agonists is their psychotropic side effects, which could hamper their suitability for long-term use. Therefore, a possible alternative devoid of these undesirable effects could rely on the activation of the ECS by the use of "indirect" agonists such as endocannabinoid uptake inhibitors (15, 16).

Our study shows that the use of UCM707, a selective inhibitor of the cellular reuptake of the endocannabinoid anandamide (17), improves motor function in TMEV-IDD-infected mice and diminishes neuroinflammation. UCM707 decreases microglial activation, infiltration of microglia/macrophages and microglial major histocompatibility complex (MHC) class II antigen expression. Additionally, it decreases the production of proinflammatory mediators such as nitric oxide (NO) and cytokines such as tumoral necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-1 $\beta$ , and IL-6. These results confirm the therapeutic potential of inhibitors of endocannabinoid uptake for the treatment of MS by the regulation of ECS activity.

## **MATERIALS AND METHODS**

### **Animals and Theiler's virus inoculation**

We used female SJL/J mice, susceptible to TMEV-IDD development, from our in-house colony (Cajal Institute, Madrid, Spain), maintained on food and water ad libitum in a 12 h light/dark cycle. Four-week-old mice were inoculated intracerebrally in the right cerebral hemisphere with 10<sup>6</sup> pfu of BeAn TMEV strain in 30  $\mu$ l of DMEM supplemented with 10% fetal calf serum

(FCS) as described previously (9). Handling of animals was performed in compliance with the guidelines of animal care set by the European Union (86/609/EEC).

## **Reagents**

Culture media and FCS were obtained from Invitrogen (Barcelona, Spain). Anandamide and lipopolysaccharide (LPS) were from Sigma (Madrid, Spain). Methanandamide dissolved in Tocrisolve was from Tocris (Bristol, UK). Cannabinoid antagonists SR141716A and SR144528 were supplied by Sanofi Recherche. UCM707 and OMDM1 were synthesized as described previously (17, 18). All other reagents were obtained from standard suppliers.

## **Evaluation of motor coordination and motor function**

At 90 days after TMEV infection, neurological dysfunction was tested by the rotarod test, which measures balance, coordination, and motor control, as described previously (9). The trial was terminated when mice fell from the apparatus or after a maximum of 5 min. Data were collected from mouse rotarod performance 1 day before the beginning of treatment and 12 days after treatment. Both naïve and TMEV-infected mice were injected i.p. with UCM707 (5 mg/kg; once a day for 12 days), methanandamide (2.5 mg/kg during the first 6 days and 3.75 mg/kg during the last 6 days of treatment), or vehicle (Tween 80:PBS, 1:14, or Tocrisolve). Seven mice were used for each treatment. Motor function was tested by measuring spontaneous locomotor activity (Activity Monitor System; Omnitech Electronics, Columbus, OH). Data were analyzed with Student's *t* test, and *P* < 0.05 was considered statistically significant.

## **Tissue processing and immunohistochemistry**

Mice were anesthetized by i.p. pentobarbital administration and perfused transcardially with 4% paraformaldehyde in 0.1 M phosphate buffer (PB). Spinal cords were collected and immersed for an additional 4 h at room temperature (RT) in the same fixative and, after several washes in PB, were cryoprotected for 2 days with a 30% solution of sucrose in 0.1 M PB. Spinal cords were divided into five segments. From each segment, ≈1 mm was embedded in Tissue-Tec and sliced in 35-μm-thick cross cryostat sections. Sections were kept at -20°C in Olmos' cryoprotective solution (30% saccharose, 1% polyvinylpyrrolidone, and 30% ethylenglycol in 0.01 M PB) until used.

Spinal cord sections were processed as described previously (9) to visualize microglia/macrophages using Mac-1 anti-CD11b antibody (Serotec, Oxford, UK) or tomato lectin (Sigma) and MHC class II antigen expression using anti H-2A class II antibody (Serotec). Immunostaining was visualized with the corresponding secondary antibodies conjugated with Alexa 488 or 594 (Molecular Probes, Eugene, OR) or with avidin-peroxidase (Dako, Barcelona, Spain) followed by counterstaining with toluidine blue.

The antibodies were used under the following conditions of incubation: tomato lectin, 1:200, 48 h at 4°C; avidin-peroxidase, 1:800, 2 h at RT; Mac-1 anti-CD11b, 1:250, 24 h at 4°C; anti-H-2A class II antibodies, 1:150, 24 h at 4°C; Alexa-conjugated secondary antibodies, 1:1000, 2 h at RT.

## Microglial cultures

Primary microglial cultures were obtained as described previously (19). For immunocytochemistry, cells were grown on coverslips, fixed in 4% paraformaldehyde for 15 min at RT, and then incubated with 1:200 OX-42 antibody (Serotec) in PBS containing 5% FCS and 0.1% Triton X-100 for 24 h at 4°C. Coverslips were then rinsed with PBS and incubated with the corresponding secondary Alexa-conjugated (1:1000) antibody for 1 h at RT. Nonspecific interactions of secondary antibodies were verified by omitting the primary antibodies. The nuclei were labeled with bis-benzimide (Hoechst 33258; 1 µg/ml for 10 min at RT). Coverslips were mounted on glass slides with fluorescent mounting medium. Preparations were visualized under a Zeiss Axiovert (Oberkochen, Germany) fluorescent microscope with a ×40 objective.

## Nitrite, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 measurements

Inducible NO synthase (iNOS) activity was assessed by measurement of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (a breakdown product of NO) accumulation in the cell culture media. After incubation (12–15 h) in the corresponding conditions according to the experiments, aliquots of the culture supernatants (100 µl) were mixed with 100 µl of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% naphthylethylenediamide in 5% phosphoric acid), a colorimetric indicator of the presence of NO<sub>2</sub><sup>-</sup> (20). Then the optical density at 550 nm (OD<sub>550</sub>) was measured and the nitrite concentration was calculated by comparison with the OD<sub>550</sub> produced using standard solutions of sodium nitrite in culture medium.

The concentration of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 in the harvested supernatants from microglial cultures was determined using enzyme-linked immunoadsorbent assays (Biosource International, CA). The detection limits were 4 pg/ml for TNF- $\alpha$ , 3 pg/ml for IL-1 $\beta$ , and 8 pg/ml for IL-6. Coefficients of intra- and interassay variation were 2.7 and 3.9%, respectively, for TNF- $\alpha$ ; 3.7 and 5.9%, respectively, for IL-1 $\beta$ ; and 6.7% and 9.4% respectively, for IL-6. There was no detectable crossreactivity with other cytokines.

## Western blot analysis

After treatments, microglial cells were washed with ice-cold PBS and lysed in TBS, pH 7.6, containing 10% glycerol, 1% Nonidet P-40, 1 mM EDTA, 1 mM EGTA plus complete protease inhibitors cocktail. Cell lysates were mixed with 5× Laemmli sample buffer and boiled for 5 min. Then equal amounts of protein (25 µg) were resolved on 10% SDS-PAGE and electroblotted at 90 V for 70 min at 4°C to nitrocellulose (Amershan Biosciences). The membranes were blocked for 1 h at RT in 5% (w/v) dry skim milk (Sveltesse, Nestlé, Barcelona, Spain) in TBS with 0.1% Tween 20 (TBST). Then, the membranes were incubated overnight at 4°C with the corresponding primary antibodies (iNOS 1:2500;  $\alpha$ -tubulin 1:30000) in 5% milk-TBST, extensively washed with 5% milk-TBST solution, and incubated with peroxidase-conjugated anti-mouse (1:8000) secondary antibody for 1 h at RT. Finally, the blots were rinsed and the peroxidase reaction was developed by enhanced chemiluminescence (Amershan Biosciences). The blots were stripped in 62.5 mM Tris-HCl, pH 6.8, containing 2% SDS and 0.7%  $\beta$ -mercaptoethanol and were reprobed sequentially.

The anti-iNOS was from BD Transduction Laboratories (San Diego, CA) and the anti- $\alpha$ -tubulin was from Sigma (Madrid, Spain). The secondary peroxidase-conjugated anti-mouse antibody was from Bio-Rad (Hercules, CA).

### **Reverse transcriptase-PCR analysis**

Before experiments, the culture medium was changed to DMEM with 1% FCS for 2 h. Microglia were exposed to LPS/IFN- $\gamma$  (50 ng/ml/100 U). In cultures treated with AEA or OMDM1, the compounds were added 30 min before LPS and maintained throughout the experiment. Eighteen hours poststimulation, total RNA was isolated with the RNeasy Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's recommendations. Reverse transcription into cDNA was performed using the AMV Reverse Transcriptase from the Reverse Transcription System kit (Promega) according to the manufacturer's recommendations. PCR was performed using the following primers derived from previously published sequence data: murine IL-1 $\beta$ , 5'-CTCCATGAGCTTTGTACAAGG-3' and 5'-TGCTGATGTACCAGTTGGGGG-3'; murine TNF- $\alpha$ , 5'-TCAGCCTCTTCTCATTCCTGC-3' and 5'-TTGGTGGTTTGCTACGACGTG-3'. In both cases, PCR amplification reactions were as follows: 94°C denaturation for 1 min, 55°C primer annealing for 1 min, and 72°C elongation for 1 min, for 35 cycles; murine MHC II  $\alpha$  chain, 5'- GCTCTCGGAGACCTATGACG-3' and 5'-ACAGGCAAACCTCTGGACAC-3'; PCR reaction as follows: 94°C denaturation for 1 min, 50°C primer annealing for 1 min, and 72°C elongation for 1 min, for 30 cycles. Glyceraldehyde-3 phosphate dehydrogenase (GAPDH) (5'- CATTGACCTCAACTACATGGT-3' and 5'-TTGTCATACCAGGAAATGAGC-3') was used as an internal standard. PCR products were analyzed on 1.5% agarose gel.

## **RESULTS**

### **Treatment with the anandamide uptake inhibitor UCM707 improves motor function on established neurological symptomatology**

Several studies correlate poor ability to perform rotarod test with demyelination induced by TMEV infection (21). TMEV-infected mice exhibited reduced ability in rotarod performance before treatment compared with sham mice ([Fig. 1A](#)), but administration of UCM707 induces a significant effect ( $P<0.05$ ) in the ability of TMEV-infected mice to perform the rotarod assay 1 day after the end of the treatment ([Fig. 1B](#)). Also, other motor parameters such as vertical and horizontal activity are ameliorated by treatment with UCM707 ([Fig. 1C](#), [1D](#)). A similar improvement in motor function is also observed after administration of methanandamide, the metabolically stable analog of anandamide ([Fig. 1B](#), [1E](#)).

### **Anandamide uptake inhibitor UCM707 reduces microglial activation in TMEV-infected mice**

Microglial cells in the spinal cord of TMEV-infected mice showed a reactive morphology in white and gray matter ([Fig. 2A](#), [2C](#)); 12 day treatment with UCM707 markedly switched their morphology toward a resting one ([Fig. 2B](#), [2D](#)).

Macrophage/microglial cells can process and present myelin epitopes in association with MHC class II molecules to CD4<sup>+</sup> T cells within the CNS of TMEV-infected mice (22). Double immunostaining for Mac-1 and H-2A (SJL/J MHC class II haplotype) revealed a predominant



colocalization of MHC class II antigen expression on Mac-1<sup>+</sup> cells in the white and gray matter of TMEV-infected mice spinal cords ([Fig. 2E](#)). One day after treatment with UCM707, positive immunostaining for MHC class II almost disappeared in microglial cells ([Fig. 2F](#)).

### **Inhibition of endocannabinoid uptake decreases the production of proinflammatory molecules by microglial cells**

The inflammatory environment promoted by the reactive microglia together with infiltrated peripheral macrophages contributes to the hampering of the remyelination process. Therefore, we assessed whether administration of UCM707 was able to diminish some of the proinflammatory factors that increase during the time course of the disease, such as NO production; iNOS expression; and proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6. Stimulation of microglial cells in culture ([Fig. 3A](#), [3B](#)) with 50 ng/ml LPS leads to an increase in the reactivity of the cells, which is accompanied by an enhancement in the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 ([Fig. 3C](#)). This effect is comparable to the inflammatory response induced after TMEV infection (23). Administration of UCM707 (5  $\mu$ M) induces a remarkable decrease in the concentration of TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  and a moderate reduction in the levels of IL-6, an effect that is dose dependent since it is enhanced by the use of a higher dose of 20  $\mu$ M ([Fig. 3C](#)).

Treatment with UCM707 decreases NO production ([Fig. 4A](#)) in a dose-dependent manner. This effect is partially blocked by coincubation with 1  $\mu$ M of the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> cannabinoid antagonists SR141716A and SR144528 ([Fig. 4C](#)) and mimicked by administration of anandamide (10  $\mu$ M) ([Fig. 5A](#)). Furthermore, UCM707 is able to potentiate the action of a subeffective dose of anandamide (1  $\mu$ M) ([Fig. 5C](#)). In all the cases, the results obtained when the two cannabinoid antagonists were used simultaneously were not significantly different from those obtained when the two compounds were administered independently; therefore, and for the sake of clarity, only the effect of both antagonists together is shown in [Fig. 4](#) and [5](#). The effects on NO levels are due to a direct effect on iNOS expression, the main enzyme involved in NO production under inflammatory conditions ([Fig. 4B](#), [4D](#), [5B](#), [5D](#)).

In an attempt to elucidate whether the inhibition of microglial reactivity by the compound UCM707 is a feature also common to other chemically unrelated inhibitors of endocannabinoid uptake such as OMDM1 (18, 24), we performed in vitro experiments with this compound in microglia cultures. Our results indicate that in microglial cells OMDM1 (5  $\mu$ M) was able to inhibit the expression of mRNA for the  $\alpha$  chain of MHC class II molecule, and also prevented IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNA expression ([Fig. 3D](#)). As expected in microglial cells, anandamide elicited a decreased expression of IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  mRNAs in agreement with the decreased protein levels as measured by ELISAs. These results indicate that inhibition of endocannabinoid uptake by structurally unrelated inhibitors markedly reduced the expression of proinflammatory molecules involved in the pathogenesis MS as well as in other chronic inflammatory diseases.

## **DISCUSSION**

The activation of the ECS with exogenous agonists has been involved in the amelioration of the motor functionality in different models of MS (8–10). Besides, it has been indicated that the endocannabinoid tone could provide a protective physiological mechanism based on the enhancement in the levels of endogenous cannabinoids that follows the progress of the disease

(11). All these effects have been justified based on the influence of the ECS on motor pathways together with its anti-inflammatory actions. Consistent with this hypothesis, administration of UCM707, an “indirect” agonist of the ECS, clearly improves the motor functionality in the TMEV-IDD MS model. This improvement runs in parallel to a decrease in microglial reactivity and a nearly complete disappearance of microglial MHC class II antigen expression within the spinal cord of TMEV-infected mice. These results are compatible with the proposed immunomodulatory mechanism by which activation of the ECS induces a decrease in the inflammatory environment. Microglial cells are one of the first cell types to respond to neuroinflammation. They acquire a reactive phenotype, by retracting their processes and migrating toward the site of injury, where they release proinflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 (25, 26). Besides, NO production by microglial cells is also associated with immune-mediated cellular cytotoxicity and pathogenesis of MS by contributing to the toxicity to oligodendrocytes (27, 28). In this regard, the expression of iNOS, the main enzyme responsible for the synthesis of NO, in the spinal cords of mice with different models of MS, has been described to correlate with the severity of the disease (29). The decrease on the levels of the proinflammatory cytokines TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , or IL-6 produced by administration of UCM707 is consistent with the neuroimmunomodulatory role proposed for the ECS. We provide further evidence for the involvement of the ECS on neuroinflammation with the results obtained using OMDM1, which again prevented the expression of mRNAs for IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$ , as well as of MHC class II antigen in microglial cells. Additionally, the inhibition of microglial NO production, which runs in parallel to a reduced expression of iNOS following UCM707 administration, may support the functional amelioration observed in agreement with previously reported studies that describe the ability of iNOS inhibitors to alleviate MS symptoms (30).

In agreement with the action of UCM707 as an “indirect” agonist of cannabinoid receptors (31), anandamide was found here to mimic its effects, while UCM707 was found to potentiate the effect of a subeffective dose of anandamide, a result that reinforces the notion that UCM707 is able to enhance endocannabinoid signaling. This result is also consistent with the observation that *in vivo* administration of methanandamide, the metabolically stable analog of anandamide, is able to induce amelioration of motor function in a similar way as UCM707, which further supports the importance of the protecting effect of anandamide in this model of MS.

Since microglial cells express both types of cannabinoid receptors (13), we evaluated their contribution to the effects induced by UCM707 and anandamide by studying these effects in the presence of the CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> antagonists SR141716A and SR144528. Coadministration of both antagonists partially reversed the observed effects. This result confirms the involvement of cannabinoid receptors but also indicates the contribution of CB<sub>1</sub>- and CB<sub>2</sub>-independent effects. However, this is not unusual considering that anandamide exerts its effects by acting on a number of receptors different from the cannabinoids, such as vanilloid receptors (32), as well as via receptor-independent mechanisms (33, 34).

These data, taken together, suggest that the endocannabinoid signaling system has a regulatory function in the inflammatory response, a notion that is consistent with the fact that microglial cells, important mediators of inflammation events, express both cannabinoid receptor subtypes as well as the molecular machinery to produce and degrade the endocannabinoids. Our results are also consistent with an up-regulation of the components involved in cannabinoid signaling, with a likely protective function, such as that reported for other MS models like CREAE (11) and, more generally, for other excitotoxic events (35). Therefore, our results confirm that the

pharmacological potentiation of ECS signaling by administration of inhibitors of endocannabinoid inactivation can constitute a promising therapeutic approach for the treatment of motor deficits associated with the progression of MS. The results of the present study with UCM707 are also in accordance with the motor improvement recently reported by our group in the same MS model and following administration of the endocannabinoid uptake inhibitors OMDM1 and OMDM2 (36), and therefore they further support the involvement of ECS in the observed effects.

In conclusion, the present study shows that activation of the ECS by using a selective anandamide uptake inhibitor such as UCM707 produces remarkable motor improvements in the chronic TMEV-IDD MS model. These therapeutic effects may be due to the role played by the ECS at the level of immunomodulation, since they run in parallel to decreases in microglial reactivity and MHC II expression. By targeting microglial cells, two structurally nonrelated endocannabinoid uptake inhibitors (UCM707 and OMDM1) compromise immune reactivity and suppress excessive production of proinflammatory cytokines and NO, thus providing a molecular pathway explaining the benefits observed against TMEV-induced demyelinating disease. These results are also in agreement with recent experiments that describe how blockade of microglial activation represses the development of the EAE model of MS (37). Our data suggest that anandamide uptake inhibitors can be used to efficaciously treat MS and confirm the protective role played by the ECS in this pathology. This type of treatment has the advantage of avoiding at least part of the undesirable side effects induced by direct activation of cannabinoid central receptors, since it results in the enhancement of the extracellular levels of endocannabinoids, available for cannabinoid receptor activation, only at those sites where there is an ongoing biosynthesis of endocannabinoids.

## ACKNOWLEDGMENTS

This work has been supported by grants from the Spanish Ministerio de Ciencia y Tecnología (SAF-2001/1246, SAF-2004/07103-C02-01, SAF-2004/416, and BQU2001-1459) and RED CIEN (C03/06 of ISCIII). S. Ortega-Gutiérrez is a predoctoral fellow from the Spanish Ministerio de Educación, Cultura y Deporte. We are grateful to Dr. G. Ortar and E. Morera for the gift of OMDM1. We gratefully appreciate Dr. M. Rodríguez (Mayo Clinic) for kind gift of Theiler's virus. We express our gratitude to R. Fernández-Senso, C. Bailón, and C. Hernández for their excellent technical assistance.

## REFERENCES

1. Noseworthy, J. H., Lucchinetti, C., Rodríguez, M., and Weinshenker, B. G. (2000) Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **343**, 938–952
2. Dal Canto, M. C., and Lipton, H. L. (1977) Multiple sclerosis-animal model: Theiler's virus infection in mice. *Am. J. Pathol.* **88**, 497–500
3. McGavern, D. B., Murray, P. D., Rivera-Quinones, C., Schmelzer, J. D., Low, P. A., and Rodríguez, M. (2000) Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis. *Brain* **123**, 519–531

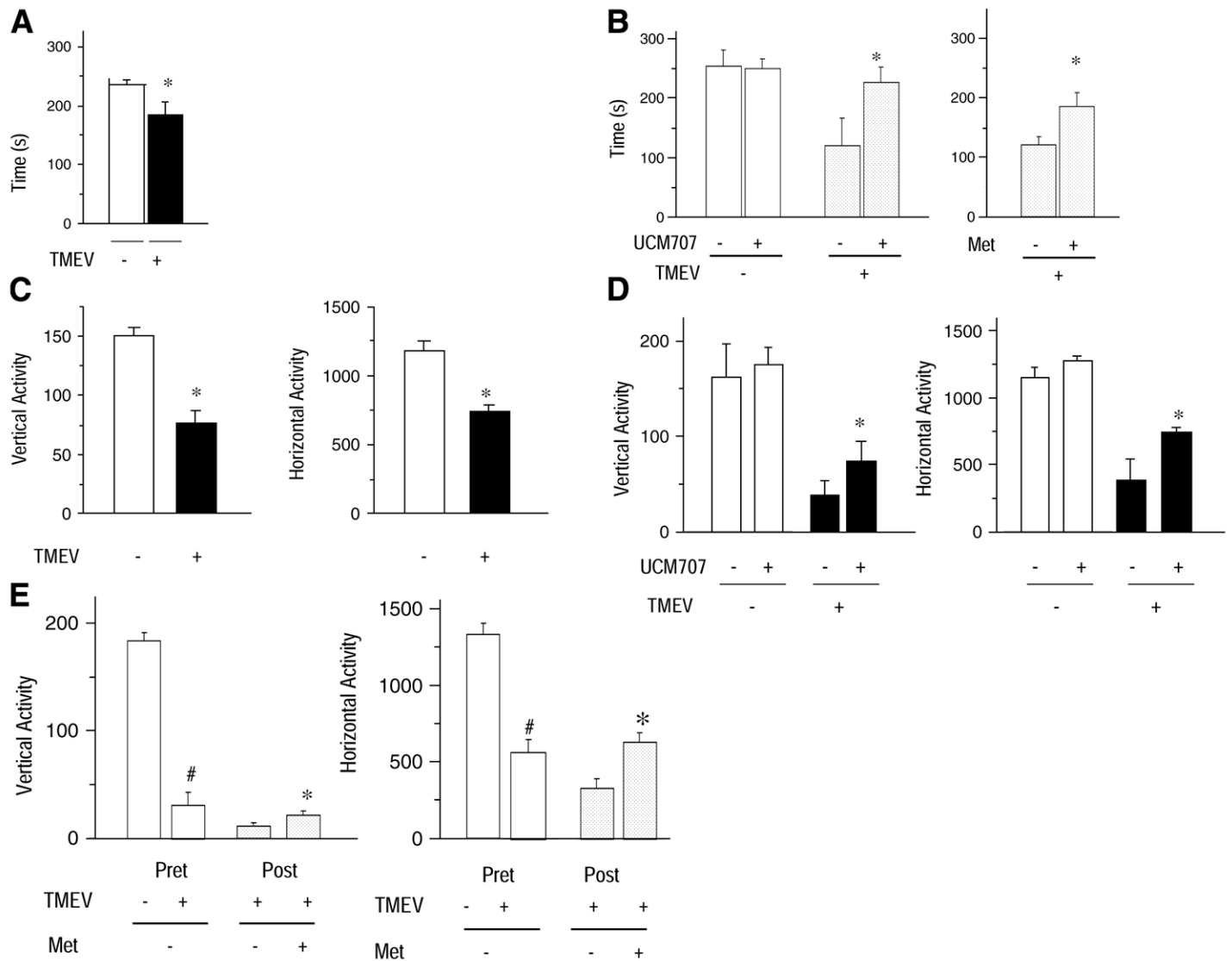
4. Goodin, D. S., Frohman, E. M., Garmany, G. P., Jr., Halper, J., Likosky, W. H., Lublin, F. D., Silberberg, D. H., Stuart, W. H., and Van den Noort, S. (2002) Disease modifying therapies in multiple sclerosis-Report of the Therapeutics and Technology Assessment Subcommittee of the American Academy of Neurology and the MS Council for Clinical Practice Guidelines. *Neurology* **58**, 169–178
5. Wiendl, H., and Hohlfeld, R. (2002) Therapeutic approaches in multiple sclerosis: lessons from failed and interrupted treatment trials. *BioDrugs* **16**, 183–200
6. Lyman, W. D., Sonett, J. R., Brosnan, C. F., Elkin, R., and Bornstein, M. B. (1989)  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol: a novel treatment for experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **23**, 73–81
7. Wirguin, I., Mechoulam, R., Breuer, A., Schezen, E., Weidenfeld, J., and Brenner, T. (1994) Suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by cannabinoids. *Immunopharmacology* **28**, 209–214
8. Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Huffman, J. W., and Layward, L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **404**, 84–87
9. Arévalo-Martín, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Borrell, J., and Guaza, C. (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 2511–2516
10. Croxford, J. L., and Miller, S. D. (2003) Immunoregulation of a viral model of multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R-(+)-WIN552122. *J. Clin. Invest.* **111**, 1231–1240
11. Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T., et al. (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* **15**, 300–302
12. Berrendero, F., Sánchez, A., Cabranes, A., Puerta, C., Ramos, J. A., García-Merino, A., and Fernández-Ruiz, J. J. (2001) Changes in cannabinoid CB1 receptors in striatal and cortical regions of rat with experimental allergic encephalomyelitis, an animal model of multiple sclerosis. *Synapse* **41**, 195–202
13. Walter, L., and Stella, N. (2004) Cannabinoids and neuroinflammation. *Br. J. Pharmacol.* **141**, 775–785
14. Pryce, G., Ahmed, Z., Hankey, D. J. R., Jackson, S. J., Croxford, J. L., Pocock, J. M., Ledent, C., Petzold, A., Thompson, A. J., Giovannoni, G., et al. (2003) Cannabinoids inhibit neurodegeneration in models of multiple sclerosis. *Brain* **126**, 2191–2202
15. Di Marzo, V., Bifulco, M., and De Petrocellis, L. (2000) Endocannabinoids and multiple sclerosis: a blessing from the inner bliss? *Trends Pharmacol. Sci.* **21**, 195–197
16. Di Marzo, V., Bisogno, T., and De Petrocellis, L. (2001) Anandamide: some like it hot. *Trends Pharmacol. Sci.* **22**, 346–349

17. López-Rodríguez, M. L., Viso, A., Ortega-Gutiérrez, S., Fowler, C. J., Tiger, G., de Lago, E., Fernández-Ruiz, J., and Ramos, J. A. (2003) Design, synthesis, and biological evaluation of new inhibitors of the endocannabinoid uptake: comparison with effects on fatty acid amidohydrolase. *J. Med. Chem.* **46**, 1512–1522
18. Ortar, G., Ligresti, A., de Petrocellis, L., Morera, E., and Di Marzo, V. (2003) Novel selective and metabolically stable inhibitors of anandamide cellular uptake. *Biochem. Pharmacol.* **65**, 1475–1481
19. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J., and Guaza, C. (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3-kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* **22**, 9742–9753
20. Green, L. C., Wagner, D. A., Glogowski, J., Skipper, P. L., Wishnok, J. S., and Tannenbaum, S. R. (1982) Analysis of nitrate, nitrite, and [<sup>15</sup>N]nitrate in biological fluids. *Anal. Biochem.* **126**, 131–138
21. McGavern, D. B., Zoecklein, L., Drescher, K. M., and Rodríguez, M. (1999) Quantitative assessment of neurologic deficits in a chronic progressive murine model of CNS demyelination. *Exp. Neurol.* **158**, 171–181
22. Katz-Levy, Y., Neville, K. L., Girvin, A. M., Vanderlugt, C. L., Pope, J. G., Tan, L. J., and Miller, S. D. (1999) Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice. *J. Clin. Invest.* **104**, 599–610
23. Sato, S., Reiner, S. J., Jensen, M. A., and Roos, R. P. (1997) Central nervous system cytokine mRNA expression following Theiler's murine encephalomyelitis virus infection. *J. Neuroimmunol.* **76**, 213–223
24. De Lago, E., Ligresti, A., Ortar, G., Morera, E., Cabranes, A., Pryce, G., Bifulco, M., Baker, D., Fernández-Ruiz, J., and Di Marzo, V. (2004) In vivo pharmacological actions of two novel inhibitors of anandamide cellular uptake. *Eur. J. Pharmacol.* **484**, 249–257
25. Kreutzberg, G. W. (1996) Microglia: a sensor for pathological events in the CNS. *Trends Neurosci.* **19**, 312–318
26. Becher, B., Prat, A., and Antel, J. P. (2000) Brain-immune connection: immuno-regulatory properties of CNS-resident cells. *Glia* **29**, 293–304
27. Parkinson, J. F., Mitrovic, B., and Merrill, J. E. (1997) The role of nitric oxide in multiple sclerosis. *J. Mol. Med.* **75**, 174–186
28. Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., and Guaza, C. (2001) LPS/IFN- $\gamma$  cytotoxicity in oligodendroglial cells: role of nitric oxide and protection by the anti-inflammatory cytokine IL-10. *Eur. J. Neurosci.* **13**, 493–502

29. Iwahasi, T., Inoue, A., Koh, C.-S., Shin, T.-K., and Kim, B. S. (1999) Expression and potential role of inducible nitric oxide synthase in the central nervous system of Theiler's murine encephalomyelitis virus-induced demyelinating disease. *Cel. Immunol.* **194**, 186–193
30. Okuda, Y., Nakatsuji, Y., Fujimura, H., Esumi, H., Ogura, T., Yanagihara, T., and Sakoda, S. (1995) Expression of the inducible isoform of nitric oxide synthase in the central nervous system of mice correlates with the severity of actively induced experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* **62**, 103–112
31. De Lago, E., Fernández-Ruiz, J., Ortega-Gutiérrez, S., Viso, A., López-Rodríguez, M. L., and Ramos, J. A. (2002) UCM707, a potent and selective inhibitor of the endocannabinoid uptake, potentiates hypokinetic and antinociceptive effects of anandamide. *Eur. J. Pharmacol.* **449**, 99–103
32. Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H.-h., Sjørgård, M., Di Marzo, V., Julius, D., and Högestätt, E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457
33. Ruiz, L., Miguel, A., and Díaz-Laviada, I. (1999)  $\Delta^9$ -Tetrahydrocannabinol induces apoptosis in human prostate PC-3 cells via a receptor-independent mechanism. *FEBS Lett.* **458**, 400–404
34. Biswas, K. K., Sarker, K. P., Abeyama, K., Kawahara, K., Lino, S., Otsubo, Y., Saigo, K., Izumi, H., Hashiguchi, T., Yamakuchi, M., et al. (2003) Membrane cholesterol but not putative receptors mediates anandamide-induced hepatocyte apoptosis. *Hepatology* **38**, 1167–1177
35. Marsicano, G., Goodenough, S., Monory, K., Hermann, H., Eder, M., Cannich, A., Azad, C., Cascio, M. G., Ortega-Gutiérrez, S., Van der Stelt, M., et al. (2003) CB<sub>1</sub> cannabinoid receptors and on-demand defense against excitotoxicity. *Science* **302**, 84–88
36. Mestre, L., Correa, F., Arévalo-Martín, A., Molina-Holgado, E., Valenti, M., Ortas, G., Di Marzo, V., and Guaza, C. (2005) Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J. Neurochem.* **92**, 1327–1339.
37. Heppner, F. L., Greter, M., Marino, D., Falsig, J., Raivich, G., Hövelmeyer, N., Waisman, A., Rülcke, T., Prinz, M., Priller, J., et al. (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat. Med.* **11**, 146–152

*Received June 10, 2004; accepted April 8, 2005.*

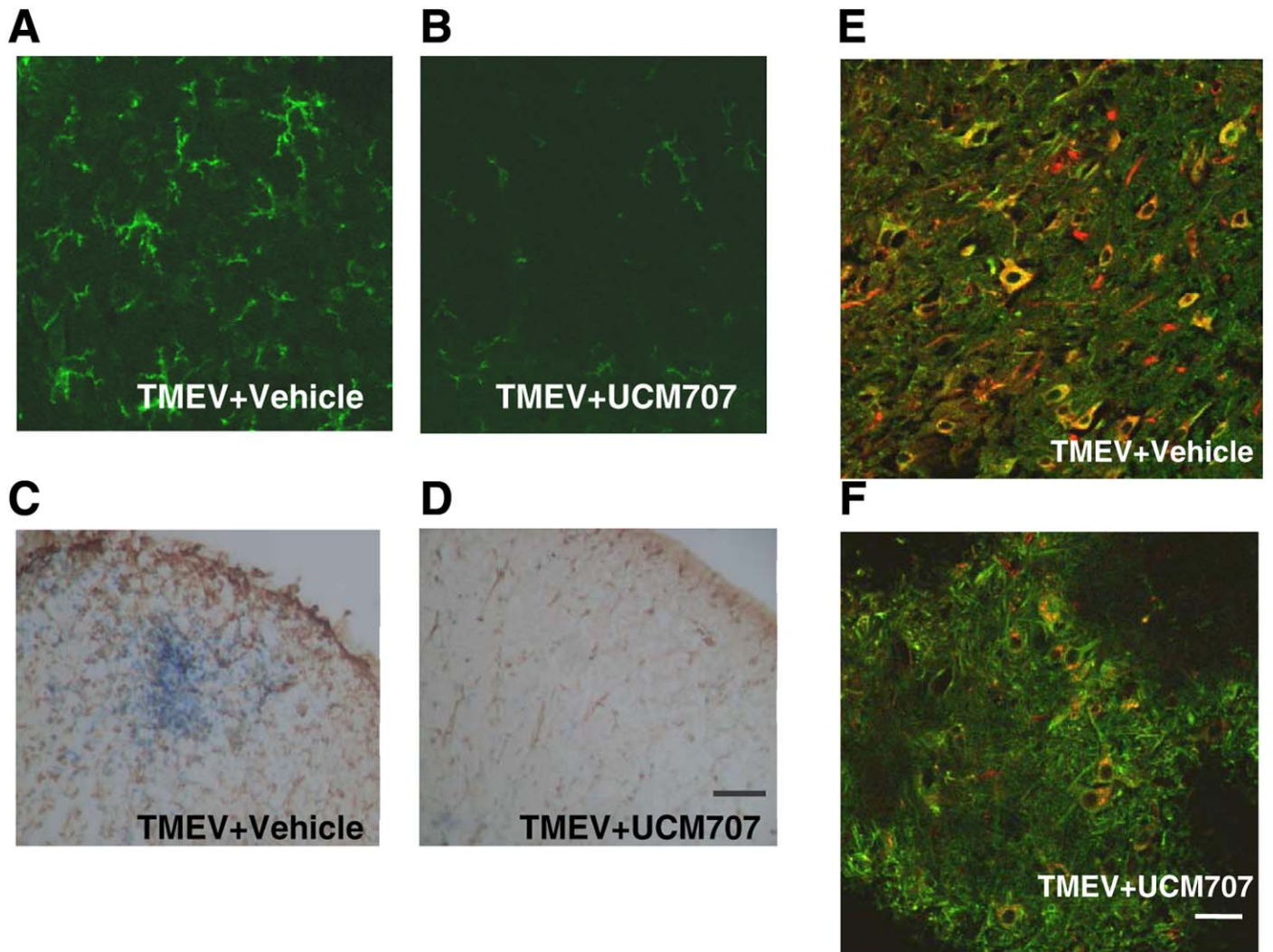
**Fig. 1**



**Figure 1.** UCM707 improves motor function. Rotarod performance before treatment (\* $P < 0.05$ ) (A) and after 12 days i.p. administration of UCM707 or methanandamide (B) (\* $P < 0.05$  vs. vehicle). C) Vertical activity (left panel) and horizontal activity (right panel) before treatment (\* $P < 0.05$ ). D) Vertical activity (left panel) and horizontal activity (right panel) after 12 days 5 mg/kg/day i.p. administration of UCM707 (\* $P < 0.05$  vs. vehicle). E) Vertical activity (left panel) and horizontal activity (right panel) before treatment (pret) and after 12 days i.p. (post) administration of methanandamide (met) (# $P < 0.05$  vs. sham; \* $P < 0.05$  vs. vehicle). Mice were assessed 1 day before treatment or 1 day after the end of the 12-day treatment protocol. Results represent means  $\pm$  SE from 14 (A, C) or 7 (B, D, E) mice per group.



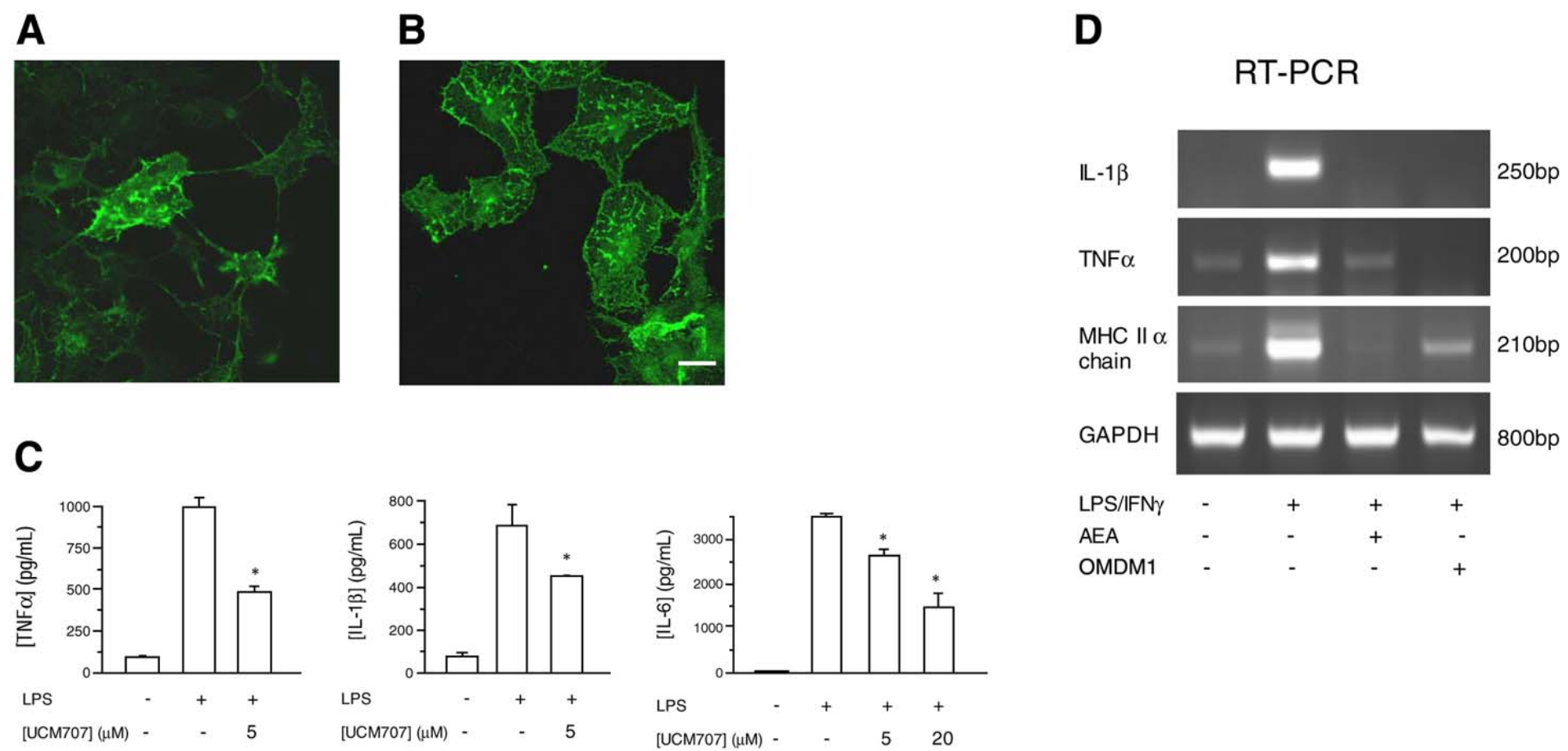
**Fig. 2**



**Figure 2.** UCM707 inhibits microglial activation and decreases the microglial MHC class II antigen expression. **A, B**) Confocal images with constant laser beam and photodetector sensitivity of microglia/macrophages (CD11b<sup>+</sup> cells) in spinal cord sections. Microglial cells in vehicle-treated mice show a reactive morphology (**A**). By contrast, 5 mg/kg UCM707 treatment markedly inhibits reactive morphology of microglia (**B**). **C, D**) Spinal cord micrographs showing microglia/macrophages (tomato lectin binding) and counterstained with toluidin blue in vehicle-treated mice (**C**) and after 5 mg/kg/day i.p. UCM707 treatment (**D**). **E, F**) Microglial MHC class II antigen expression. CD11b is shown in green and the MHC class II complex is shown in red. Note antibody colocalization (yellow) in vehicle-treated mice (**E**) vs. UCM707-treated mice (**F**). **A, B, E, F**) Scale bar, 40  $\mu$ m. **C, D**) Scale bar, 50  $\mu$ m.

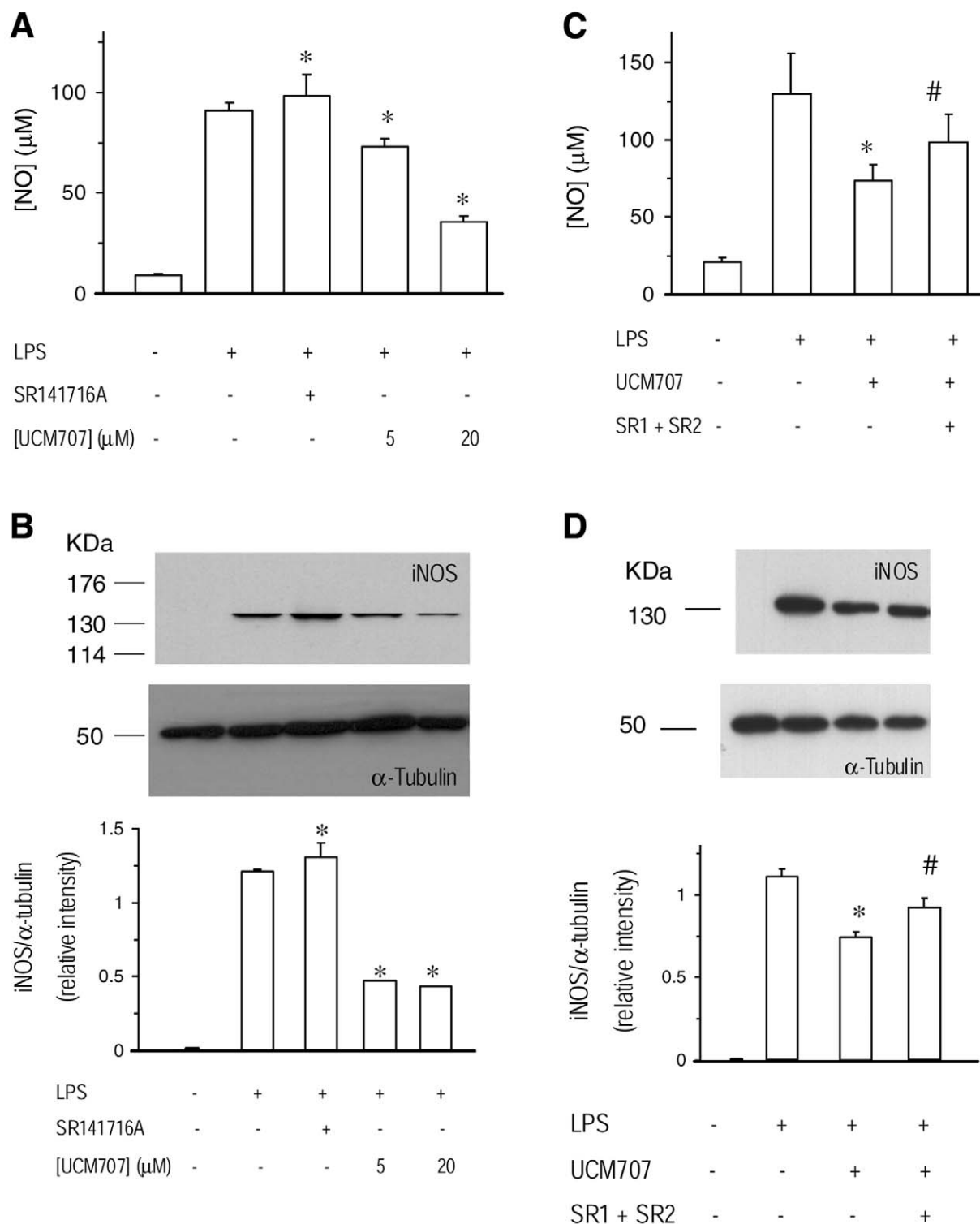


**Fig. 3**



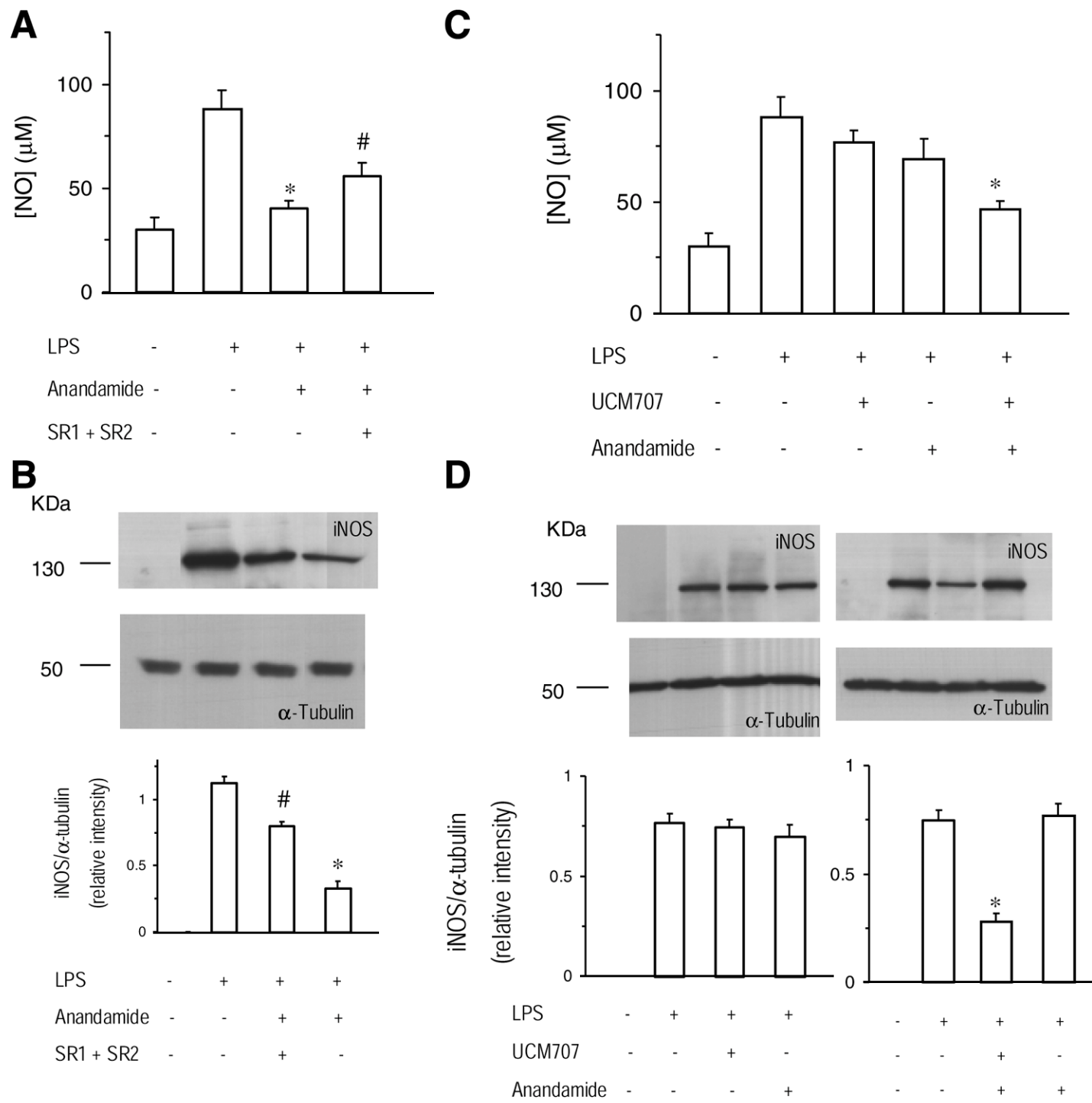
**Figure 3.** Effect of endocannabinoid uptake inhibitors on proinflammatory molecule expression by microglial cells. Immunofluorescence staining of microglial cells in culture with anti-OX-42 in the absence (**A**) or the presence (**B**) of 50 ng/ml LPS. **C**) Effect of UCM707 on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and IL-6 release by LPS (50 ng/ml) stimulated microglial cells. Results are means  $\pm$  SE of at least three independent experiments performed in duplicate. (\* $P$ <0.05 vs. LPS). **D**) Effect of OMDM1 (5  $\mu$ M) and anandamide (10  $\mu$ M) on TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , and MHC class II mRNAs expression induced by LPS/IFN- $\gamma$  (50 ng/ml/100 U) stimulated microglial cells. A representative experiment of three independent experiments is shown.

**Fig. 4**



**Figure 4.** UCM707 diminishes  $\text{NO}_2^-$  production and iNOS expression and these effects are partially blocked by cannabinoid antagonists. **A, B**) Effect of LPS (50 ng/ml), SR141716A (1  $\mu\text{M}$ ), and different concentrations of UCM707 on  $\text{NO}_2^-$  production in microglial cells (**A**) and on iNOS expression by microglial cells (**B**). **C, D**) Effect of SR141716A (1  $\mu\text{M}$ ), SR144528 (1  $\mu\text{M}$ ), and UCM707 (5  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{NO}_2^-$  production (**C**) and on iNOS expression (**D**) by microglial cells stimulated with LPS (50 ng/ml). Results are means  $\pm$  SE of at least three independent experiments performed in duplicate. (\* $P < 0.05$  vs. LPS, # $P < 0.05$  vs. UCM707).

**Fig. 5**



**Figure 5.** Effects of anandamide on  $\text{NO}_2^-$  levels and iNOS expression and potentiation of the effect of a subeffective dose of anandamide by UCM707. **A, B)** Effects of anandamide (10  $\mu\text{M}$ ), SR141716A (1  $\mu\text{M}$ ), and SR144528 (1  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{NO}_2^-$  production (**A**) and iNOS expression (**B**) by microglial cells. **C, D** Effects of anandamide (1  $\mu\text{M}$ ) and UCM707 (1  $\mu\text{M}$ ) on  $\text{NO}_2^-$  production (**C**) and iNOS expression (**D**) by microglial cells. Results are means  $\pm$  SE of two independent experiments performed in duplicate. (\* $P < 0.05$  vs. LPS, # $P < 0.05$  vs. anandamide).

# Anandamide inhibits IL-12p40 production by acting on the promoter repressor element GA-12: possible involvement of the COX-2 metabolite prostamide E<sub>2</sub>

Fernando CORREA\*, Fabian DOCAGNE\*, Diego CLEMENTE\*, Leyre MESTRE\*, Christoph BECKER† and Carmen GUAZA\*<sup>1</sup>

\*Neuroimmunology Group, Functional and Systems Neurobiology Department, Instituto Cajal, CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Madrid, Spain, and

†Laboratory of Immunology I, University of Mainz, Germany

The eCB [endoCB (cannabinoid)] system is being considered as a novel therapeutic target for immune disorders. Cytokines of the IL-12 (interleukin-12) family have essential functions in cell-mediated immunity. In the present study, we have addressed the mechanisms of action of the eCB AEA (anandamide) on the regulation of IL-12p40 in activated microglia/macrophages. We demonstrated that AEA can inhibit the expression of p35, p19 and p40 subunits, which form the biologically-active cytokines IL-12 and IL-23 in microglia stimulated with LPS (lipopolysaccharide)/IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ). Additionally, we have provided evidence that AEA reduces the transcriptional activity of the IL-12p40 gene in LPS- and IFN $\gamma$ -co-activated cells, and this is independent of CB or vanilloid receptor activation. Site-directed mutagenesis of the different elements of the p40 promoter showed that AEA regulates IL-12p40 expression by acting on the repressor site GA-12 (GATA sequence in IL-12 promoter). Prostamide

E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub> ethanolamide), a product considered to be a putative metabolite of AEA by COX-2 (cyclo-oxygenase 2) oxygenation, was also able to inhibit the activity of the IL-12p40 promoter by acting at the repressor site. The effects of AEA and prostamide E<sub>2</sub> on p40 transcription were partially reversed by an antagonist of EP<sub>2</sub> (prostanoid receptor-type 2), suggesting the possibility that prostamide E<sub>2</sub> may contribute to the effects of AEA on IL-12p40 gene regulation. Accordingly, the inhibition of COX-2 by NS-398 partially reversed the inhibitory effects of AEA on IL-12 p40. Overall, our findings provide new mechanistic insights into the activities of AEA in immune-related disorders, which may be relevant for the clinical management of such diseases.

**Key words:** anandamide (AEA), endocannabinoid, interleukin-12 (IL-12) p40 subunit, microglia, multiple sclerosis (MS), prostamide E<sub>2</sub>.

## INTRODUCTION

eCBs [endoCBs (cannabinoids)] are lipid signalling mediators that play an important role in immunomodulation, and have also been shown to be useful in the treatment of chronic inflammatory diseases [1,2]. Microglial cells constitute a population of 'facultative' macrophages adapted to the neural environment which play a critical role in CNS (central nervous system) immune surveillance and in the initiation and maintenance of intracerebral immune responses. Neurological disorders, such as MS (multiple sclerosis), involve activation and even dysregulation of microglial cells that, in addition to their phagocytic function, participate in the regulation of non-specific inflammation as well as in adaptive immune responses [3]. Both exogenous and endogenous CBs have been shown to be efficient in attenuating disease symptomatology and inflammatory reactions in chronic relapsing-remitting EAE (experimental autoimmune encephalomyelitis) and TMEV (Theiler's murine encephalomyelitis virus), which are experimental models of MS [4–9].

IL-12 (interleukin-12) is a heterodimeric cytokine formed from two subunits, p35 and p40, which regulates innate immunity and determines the type and duration of adaptive immunity [10]. IL-12 is produced mainly by monocytes, macrophages and dendritic cells, as well as brain microglia [11]. Besides forming

the IL-12p70 heterodimer, the p35 and p40 subunits may dimerize with alternative partners to form distinct bimolecular complexes. For example, the p19 subunit, which lacks biological activity, combines with the p40 subunit to form IL-23, which regulates the clonal expansion of T-cells [12]. There is evidence suggesting that dysregulation of the IL-12 gene may contribute to the initiation and perpetuation of various autoimmune and chronic inflammatory diseases [13]. Despite the described reduction in IL-12 in *Legionella pneumoniae* infection after administration of the main psychoactive compound of *Cannabis sativa*,  $\Delta^9$ -tetrahydrocannabinol, the mechanisms underlying this response are still unclear [14].

The eCB family contains several structurally-related lipids which may be synthesized and released by immune cells to act locally in an autocrine or paracrine manner [15]. CBs mainly act through two distinct G-protein-coupled receptors, CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub>. However, these CB molecules have been demonstrated to exert effects independently of CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor activation. These effects have been proposed to be mediated through several unidentified receptors, or to occur in a membrane receptor-independent fashion [1]. Within the CNS, neurons, microglial cells and astrocytes are able to synthesize the eCBs AEA (anandamide) and 2-arachidonoylglycerol [16–18]. During neuroinflammation, eCBs are released mainly by microglial

Abbreviations used: AEA, anandamide; CB, cannabinoid; C/EBP, CCAAT/enhancer-binding protein; CNS, central nervous system; COX-2, cyclo-oxygenase 2; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; EAE, experimental autoimmune encephalomyelitis; eCB, endoCB; EP<sub>2</sub> etc., prostanoid receptor-type 2 etc.; ETS, E twenty-six; FAAH, fatty acid amidohydrolase; FBS, fetal bovine serum; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IFN $\gamma$ , interferon  $\gamma$ ; IL-12 etc., interleukin-12 etc.; GA-12, GATA sequence in IL-12 promoter; LPS, lipopolysaccharide; MS, multiple sclerosis; NF- $\kappa$ B, nuclear factor  $\kappa$ B; prostamide E<sub>2</sub>, prostaglandin E<sub>2</sub> ethanolamide; RT-PCR, reverse transcription-PCR; SR1, SR141716A; SR2, SR144528; TMEV, Theiler's murine encephalomyelitis virus; TRPV, transient receptor potential vanilloid.

<sup>1</sup> To whom correspondence should be addressed (email cgjb@cajal.csic.es).

cells and exert neuroprotective actions. In particular, AEA has been shown to protect neurons from inflammatory damage [19]. However, despite the therapeutic relevance of eCBs, the mechanisms of their actions on the immune system remain unknown, and studies on the role of AEA on microglial function are scarce. As a typical eCB, AEA is inactivated by a reuptake system and is metabolized mainly by FAAH (fatty acid amidohydrolase) [20]. In addition, AEA may also be oxygenated by COX-2 (cyclo-oxygenase 2) to form prostamide E<sub>2</sub> (prostaglandin E<sub>2</sub> ethanolamide) [21].

In the present study, we investigated the role of AEA in the regulation of IL-12 and related cytokines in activated macrophages and microglial cells. First, we assessed whether AEA modified the level of mRNA expression of the p19, p35 and p40 subunits of IL-12 and IL-23, as well as expression of IL12p40 protein in LPS (lipopolysaccharide)/IFN $\gamma$ -activated microglial cells. We further analysed the regulation of IL-12p40 promoter activity by AEA using RAW 264.7 and BV-2 murine microglial cells as cellular models. We identified the response element for AEA action on the IL-12 p40 promoter. The involvement of CB and vanilloid receptors in the activity of AEA was also explored, as well as the putative involvement of the COX-2 pathway in modulation of the effects of AEA.

## EXPERIMENTAL

### Materials

Culture medium and FBS (fetal bovine serum) were from Invitrogen. AEA and LPS were from Sigma. Murine recombinant IFN $\gamma$  (interferon  $\gamma$ ) was from PeproTech EC (London, U.K.). The CB antagonists SR1 (SR141716A) [N-piperidino-5-(4-chlorophenyl)-1-(2,4-dichlorophenyl)-4-methyl-3-pyrazol-carboxamide] and SR2 (SR144528) {N-(1S)-endo-1,3,3-trimethylbicyclo[2.2.1]heptan-2-yl]-5-(4-chloro-3methylphenyl)-1-(4-methylbenzyl)-pyrazole-3-carboxamide} were supplied by Sanofi Recherche (Montpellier, France). Prostamide E<sub>2</sub> and AH6809 (6-isopropoxy-9-oxoxanthene-2-carboxylic acid) were obtained from Cayman Chemical (Ann Arbor, MI, U.S.A.). AH23848B was kindly supplied by GlaxoSmithKline (GSK). Capsazepine {N-[2-(4-chlorophenyl)ethyl]-1,3,4,5-tetrahydro-7,8-dihydroxy-2H-2-benzazepine-2-carbothionamide} was obtained from Alexis Biochemicals (Lausen, Switzerland). NS-398 was purchased from Calbiochem. All other reagents were obtained from standard suppliers.

### Animals

Balb/c mice from our in-house colony (Cajal Institute, Madrid, Spain) were used. Animals were housed in cages with filter tops in a laminar flow hood and maintained on food and water *ad lib.* in a 12 h dark/light cycle. Handling of animals was performed in compliance with the Guidelines of Animal Care set by the European Union (86/609/EEC).

### Cell line cultures

The murine macrophage cell line RAW 264.7 was purchased from the Center of Biological Sciences [CIB (Centro de Investigaciones Biológicas)–CSIC (Consejo Superior de Investigaciones Científicas), Madrid, Spain]. Cells were grown in DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) supplemented with 2 mM L-glutamine, 10 % (v/v) FBS and 1 % (v/v) penicillin/streptomycin, and passaged every 5 days for a maximum of

30 passages. Cells were grown in a humidified environment containing 5 % CO<sub>2</sub> and at a constant temperature of 37°C. BV-2 murine microglial cells were purchased from the ICLC (Interlab Cell Line Collection; Istituto Nazionale per la Ricerca sul Cancro, Genoa, Italy). These cells exhibit morphological and functional properties comparable with primary microglia.

### Microglial cultures

Primary mixed glial cultures were prepared as described previously [22]. Briefly, forebrains of newborn Balb/c mice were dissociated mechanically, filtered through a 150  $\mu$ m nylon mesh, resuspended in DMEM containing 10 % (v/v) heat-inactivated FBS, 10 % (v/v) horse serum and 1 % (w/v) penicillin/streptomycin and plated on poly-L-lysine-coated 75 cm<sup>2</sup> flasks (Falcon; Le Pont de Claix, France). After 15 days in culture, the flasks were shaken at 230 rev./min at 37°C for 3 h to remove loosely adherent microglia. The supernatant was plated on multiwell culture plates for 2 h. After this, the medium was changed to remove non-adherent cells. Cells were grown in a humidified environment containing 5 % CO<sub>2</sub> and held at a constant temperature of 37°C. The purity of microglial cultures was assessed by examining cell morphology under phase-contrast microscopy and was confirmed by immunostaining with anti-CD11b antibody (Serotec).

### Cell treatment

Prior to each experiment, DMEM containing serum was removed and replaced with fresh serum-free DMEM. Microglia or cell lines were stimulated with both LPS (50 ng/ml) and IFN $\gamma$  (100 units/ml) concurrently. The concentrations of the various treatments used in the experiments were: AEA (1, 5 and 10  $\mu$ M), SR1 (1  $\mu$ M), SR2 (1  $\mu$ M), capsazepine (10  $\mu$ M), prostamide E<sub>2</sub> (10  $\mu$ M unless stated otherwise), NS-398 (10  $\mu$ M), AH6809 (10  $\mu$ M) and AH23848B (30  $\mu$ M).

### Plasmids

Plasmid constructs for the luciferase reporter vector were generated as described previously for the p40/pGL2B [23] and for the p40/pXP1 [24] constructs. Mutant p40/pXP1 plasmids were generated by site-directed mutagenesis as described by Becker et al. [24]. Mutant primer sequences are as follows (mutated bases are underlined): ETS (E twenty-six): 5'-CCCAAAAGTCATTAA-CTCTTAGTTC-3'; NF- $\kappa$ B (nuclear factor  $\kappa$ B): 5'-GAACTTCTTGAAATTAGCCCAGAAGG-3'; GA-12 (GATA sequence in IL-12 promoter) primer 1: 5'-CTCGTTTTCTACACACAC-3'; GA-12 primer 3: 5'-CTCGTTTTGATACATCCAC-3'; and C/EBP (CCAAT/enhancer-binding protein): 5'-TGTTT-TCAATGTTCTAACAAGTCAGT-3'.

### Transfections and reporter gene analysis

The p40/pGL2B or the p40/pXP1 firefly reporter vector (200 ng/cm<sup>2</sup>) along with a *Renilla* luciferase expression vector (Promega) were transiently transfected into RAW 264.7 cells using Lipofectamine<sup>TM</sup> (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions. After 18 h incubation, the medium was removed and replaced with fresh serum-free DMEM and, after a further 2 h incubation, cells were stimulated as described in each case. Stimulation was allowed to proceed for 18 h before cells were harvested, washed with 0.1 M PBS (pH 7.4) and lysed in cell lysis buffer (Promega). Luciferase activity (both firefly and *Renilla* luciferase activity) was evaluated using the Dual-Luciferase<sup>®</sup> reporter assay system (Promega), which allows

simultaneous expression and measurement of two individual reporter enzymes within a single system. Values were normalized to the *Renilla* luciferase activity (Promega). Thus the experimental reporter (firefly luciferase) was correlated with the effect of specific experimental conditions, whereas the activity of the co-transfected control (*Renilla* luciferase) reporter provided an internal control. Normalizing the activity of the experimental reporter to the activity of the internal control minimized experimental variability due to differences in cell toxicity, transfection efficiency and proliferation. Luciferase activity (firefly and *Renilla*) was measured as light emission over a period of 10 s with a standard luminometer (Sirius, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Germany).

### Decoy oligonucleotides assay

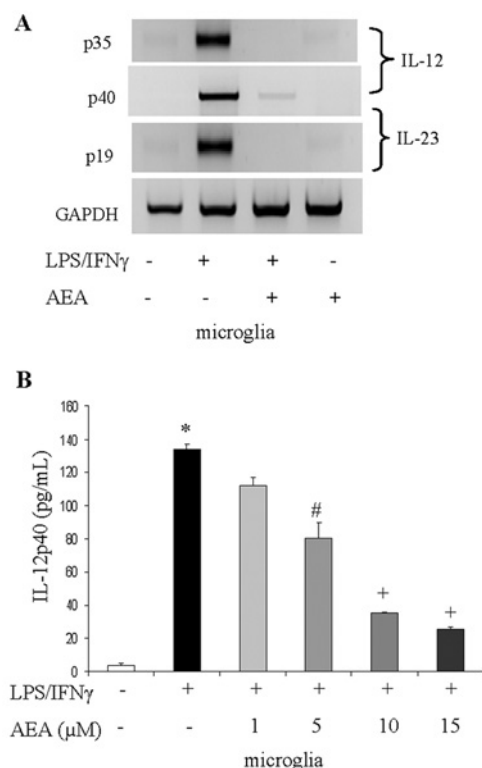
Decoy double-stranded oligonucleotides were transfected into RAW 264.7 cells in an attempt to interfere with the binding of LPS- and IFN $\gamma$ -activated transcription factors to their *cis*-acting elements within the GA-12 sequence. The sequences of the oligonucleotides used are as follows: decoy GA-12 wild-type, 5'-CTCGTTTTGATACACACACAGAGA-3'; and decoy GA-12 mutant 1, 5'-CTCGTTTTCTACACACACAGAGA-3'. These oligonucleotides were co-transfected into the RAW 264.7 cells together with the reporter constructs. After 18 h incubation, cell lysates were prepared and assayed for dual-luciferase activity as described above.

### Semi-quantitative RT-PCR (reverse transcription-PCR)

Total RNA from microglial primary cultures was prepared using RNeasy extraction columns (Qiagen). Samples (1  $\mu$ g) of total mRNA were transcribed into cDNA using the Reverse Transcription system kit (Promega) according to the manufacturer's instructions. cDNA libraries were amplified by PCR with oligonucleotides for GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), IL-12p35 (p35) subunit, IL-12/23p40 (p40) subunit and IL-23p19 (p19) subunit (PCR products of 800, 300, 250 and 190 bp respectively). The GAPDH primers sequences were: sense 5'-CATTGACCTCAACTACATGGT-3' and antisense 5'-CATTGACCTCAACTACATGGT-3'. The p35 oligonucleotides were: sense 5'-ATGACCCTGTGCCTTGGTAG-3' and antisense 5'-CAGATAGCCCATCACCTGT-3'. The p40 oligonucleotides were: sense 5'-AGGTGCGTTCCTCGTAGAGA-3' and antisense 5'-AAAGCCAACCAAGCAGAAGA-3'. The p19 oligonucleotides were: sense 5'-GACTCAGCCAACCTCCTCCAG-3' and antisense 5'-GGCACTAAGGGCTCAGTCAG-3'. The conditions for amplification of GAPDH were 94 °C for 1 min (denaturation), 60 °C for 1 min (primer annealing) and 72 °C for 1 min (elongation); for 35 cycles. The amplification conditions for p35 and p40 were 94 °C for 1 min, 50 °C for 1 min and 72 °C for 1 min; for 40 cycles. The amplification conditions for p19 were 94 °C for 1 min, 55 °C for 1 min and 72 °C elongation for 1 min; for 35 cycles. The PCR products were analysed by separation on 1.5 % (w/v) agarose gels. The specificity of the PCR products was confirmed by direct sequencing, which demonstrated 100 % homology with the original sequences.

### IL-12p40 ELISA

Levels of IL-12p40 in microglial culture supernatants were quantified using specific ELISA kits purchased from Biosource International (Camarillo, CA, U.S.A.), according to the manufacturer's instructions. The assay detected >2 pg/ml and the



**Figure 1** AEA represses the expression of IL-12p35, IL-12p40 and IL-23p19 subunits in activated microglia

(A) Microglial cells stimulated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) showed an induction in the mRNA expression of p35, p40 and p19 subunits, as determined by semi-quantitative RT-PCR. This induction was down-regulated by co-treatment with AEA (10  $\mu$ M). (B) Levels of IL-12p40 protein were determined by ELISA in the supernatant of microglial cultures after 18 h stimulation with both LPS and IFN $\gamma$ . The augmented levels of the p40 subunit in the supernatants from LPS and IFN $\gamma$ -co-stimulated (LPS/IFN $\gamma$ ) microglia were diminished after co-treatment with 0, 1, 5, 10 or 15  $\mu$ M AEA in a dose-response fashion. Results are means  $\pm$  S.E.M. ( $n = 3$ ), with each experiment performed in triplicate. \*,  $P < 0.05$  compared with control; #,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ .

intra- and inter-assay coefficients of variations were between 3.3 and 4.5 % and 5.6 and 6.7 % respectively.

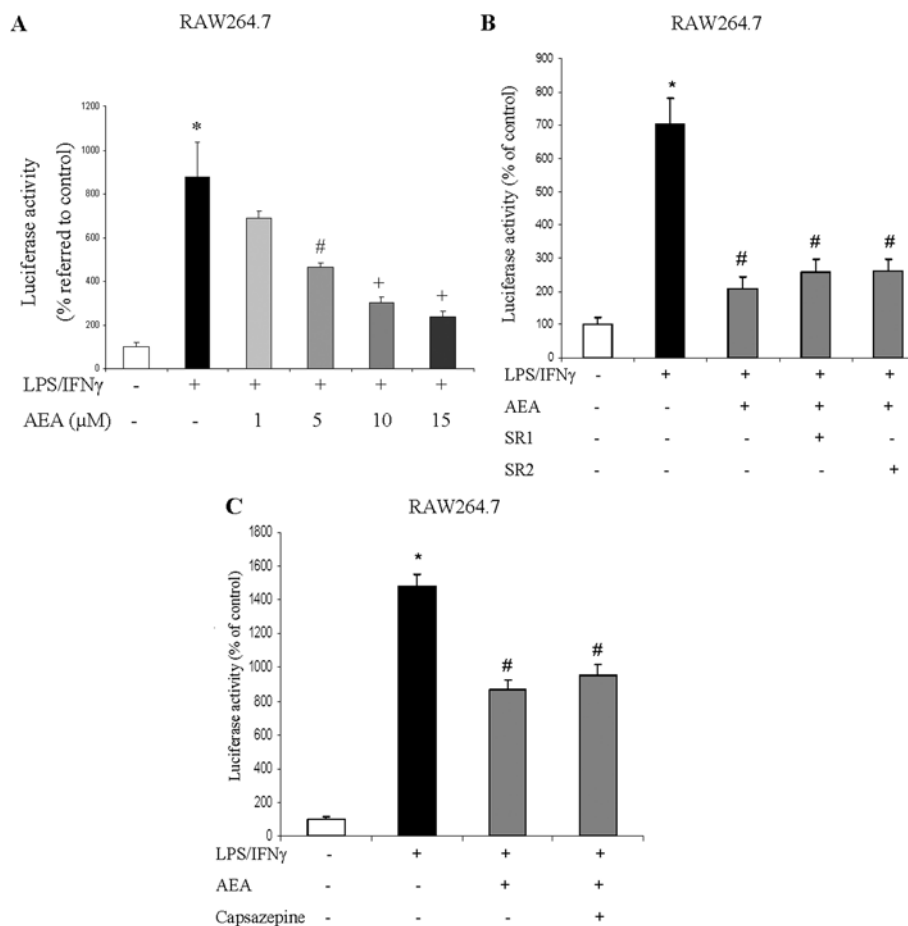
### Statistical analysis

Results are means  $\pm$  S.E.M. of at least three experiments performed with different cell preparations. Analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test for multiple comparison was used to determine statistical significance (95 %;  $P < 0.05$ ).

## RESULTS

### AEA negatively regulates the induction of both IL-12 (p40/p35) and IL-23 (p40/p19) in LPS- and IFN $\gamma$ -activated microglia

We first studied the microglial responses to AEA treatment when it was co-administered with both LPS and IFN $\gamma$  (50 ng/ml and 100 units/ml respectively). The stimulation of murine microglial cells with both LPS and IFN $\gamma$  up-regulated the levels of mRNA for IL-12 (p40/p35) and IL-23 (p40/p19) (Figure 1A), as shown by semi-quantitative RT-PCR. To assess the effects of AEA on the expression of these subunits, we treated microglial cells with LPS and IFN $\gamma$  concurrently, and with AEA. Experiments with different AEA doses (1, 5, 10 and 15  $\mu$ M) on IL-12p40 protein



**Figure 2** AEA reduces IL-12p40 promoter activity independently of CB or vanilloid receptors

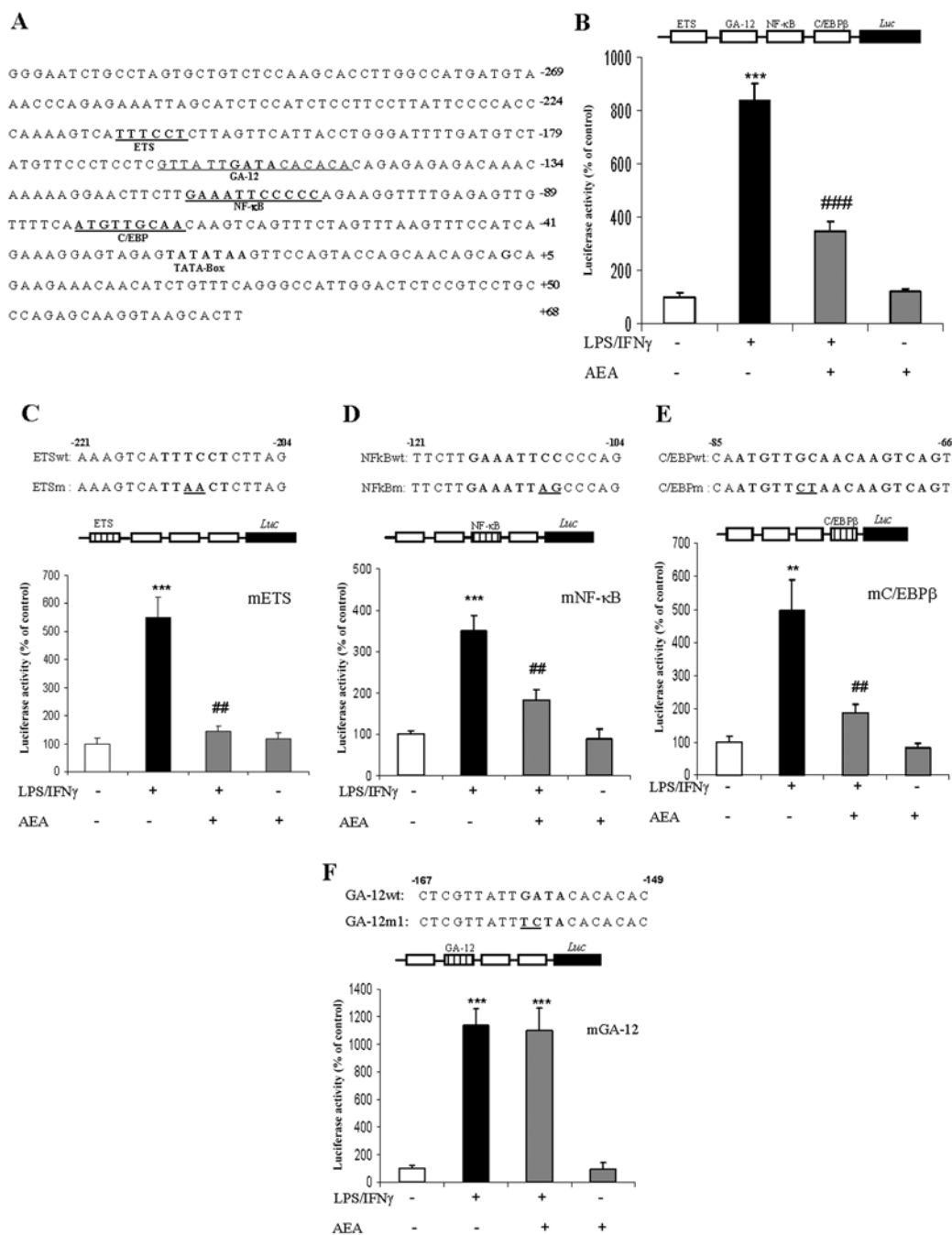
(A) RAW 264.7 cells were transiently transfected with a wild-type p40/pGL2B promoter gene construct. Cells were left untreated or were stimulated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) in the presence or absence of different doses of AEA (0, 1, 5, 10 or 15  $\mu$ M) prior to luciferase measurement. Luciferase activity was normalized to Renilla luciferase activity. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*,  $P < 0.02$  compared with control; #,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ . (B) RAW 264.7 cells were transiently transfected with a wild-type p40/pGL2B promoter gene construct. Transfected cells were pre-treated with the CB antagonists SR1 or SR2 (1  $\mu$ M) for 1 h, and subsequently treated with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) and with AEA (10  $\mu$ M). Luciferase activity was measured 18 h after the last treatment. Neither SR1 nor SR2 were capable of reversing the effects of AEA on p40 promoter activity. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*,  $P < 0.005$  compared with control; #,  $P < 0.002$  compared with LPS and IFN $\gamma$ . (C) RAW 264.7 cells were transiently transfected with 400 ng/cm $^2$  of the wild-type p40/pGL2B promoter gene construct. Transfected cells were pre-treated with the TRPV $_1$  antagonist capsazepine (10  $\mu$ M) for 1 h and then treated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) and with AEA (10  $\mu$ M). Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*,  $P < 0.001$  compared with control; #,  $P < 0.005$  compared with LPS and IFN $\gamma$ .

expression (Figure 1B) led us to select the dose of 10  $\mu$ M AEA for subsequent experiments. None of the doses of AEA (1–15  $\mu$ M) exhibited cell toxicity effects, as detected by the lactate dehydrogenase assay (results not shown). In all cases, AEA (10  $\mu$ M) was able to reverse the induction of p40, p35 and p19 subunits caused by LPS and IFN $\gamma$  treatment (Figure 1A).

#### AEA suppresses IL-12p40 promoter activity independently of activation of CB $_1$ , CB $_2$ or TRPV $_1$ (transient receptor potential vanilloid $_1$ ) receptors

Since p40 is the common subunit in both biologically active IL-12 and IL-23, we decided to focus our study on the effects of AEA on this particular subunit. To delineate the mechanisms underlying the inhibitory effects of AEA on the production of IL-12p40, its effects on LPS and IFN $\gamma$  activation of the p40 promoter were explored. The RAW 264.7 murine macrophage cell line has been extensively used as a cellular model to study the regulation of p40 promoter activity [23–25]. RAW 264.7 cells also express CB $_1$  and CB $_2$  receptors, making them suitable

for studying the regulation of IL-12p40 expression by eCBs [26]. Therefore we used RAW 264.7 cells as the main cellular model for reporter gene experiments in the present study. Cells were transiently transfected with a luciferase reporter gene construct driven by the wild-type IL-12p40 promoter [23]. Stimulation with both LPS and IFN $\gamma$  caused a strong induction of IL-12p40 transcriptional activity, which was significantly reversed by co-treatment with AEA at different doses, as shown in Figure 2(A). AEA, when applied alone, did not induce any change in p40 promoter activity. We also confirmed the inhibitory effects of AEA on IL-12 p40 transcription in the BV-2 microglial cell line (results not shown). The involvement of the CB receptors CB $_1$  and CB $_2$  in mediating the inhibitory effects of AEA was explored by assessing the ability of the CB $_1$  and CB $_2$  receptor antagonists, SR1 and SR2 respectively, to regulate the inhibitory effect of AEA. As shown in Figure 2(B), the presence of SR1 or SR2 had no influence on the inhibitory effect of AEA on IL-12 p40 transcription. This suggests a lack of involvement of the CB $_1$  or CB $_2$  receptors in mediating the effects of AEA. Because several studies have demonstrated that AEA also behaves as a full



**Figure 3** AEA reduces the activity of the p40 promoter through activation of the repressor site GA-12

(A) Summary of consensus binding sites on the -300 to +68 promoter region of the IL-12p40 gene. (B) RAW 264.7 cells were transiently transfected with a reporter gene construct containing the wild-type p40 promoter. Cells were stimulated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  together (LPS/IFN $\gamma$ ) and with AEA (10  $\mu$ M) prior to luciferase activity measurement. Non-treated transfected cells were used as a control. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n=12$ ). \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ###,  $P < 0.001$  compared with LPS and IFN $\gamma$ . (C-E) RAW 264.7 cells were transiently transfected with mutant p40/pXP1 reporter gene constructs carrying 2 bp mutations at the indicated (underlined) promoter sites (ETS (mETS) (C), NF-κB (mNF-κB) (D) or C/EBP $\beta$  (mC/EBP $\beta$ ) (E)), as indicated in each panel. In all three cases, induction of p40 promoter activity was lower when compared with the wild-type promoter (ETSw, NFκBwt and C/EBPwt respectively). The mutation was unable to interfere with the actions of AEA (10  $\mu$ M) in reducing the induction caused by stimulus with both LPS and IFN $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ ). Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ##,  $P < 0.005$  compared with LPS and IFN $\gamma$  (C); \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ##,  $P < 0.001$  compared with LPS and IFN $\gamma$  (D); \*\*,  $P < 0.002$  compared with control; ##,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$  (E). (F) RAW 264.7 cells were transiently transfected with 2 bp mutated (underlined) GA-12 region (mGA-12) p40/pXP1 construct. The mutation of the repressor element interfered with the actions of 10  $\mu$ M AEA. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control (GA-12wt). In all cases  $n=12$ .

agonist and a modulator of the vanilloid receptor, namely TRPV $_1$  [27], we investigated whether the effects of AEA could be the result of AEA modulating TRPV $_1$  receptors. RAW 264.7 cells transfected with the p40 promoter construct were treated

with the TRPV $_1$  antagonist capsazepine at the effective dose (10  $\mu$ M) [27] prior to treatment with LPS, IFN $\gamma$  and AEA. As shown in Figure 1(C), pre-treatment with capsazepine was unable to prevent the effects of AEA on p40 promoter activity.



### The GATA repressor promoter site is critical for the inhibitory actions of AEA on IL-12p40 gene expression

Studies on the regulation of IL-12p40 promoter activity indicate that the IL-12p40 promoter contains several binding sites for transcription factors that contribute to gene regulation in LPS-stimulated macrophages. The three control elements that have been most extensively characterized bind NF- $\kappa$ B, C/EBP $\beta$  and ETS transcription factor family members. In addition, a control repressor element, termed GA-12, has been characterized [24]. To investigate the molecular mechanisms controlling the transcription of IL-12p40 under AEA exposure, we performed a series of experiments to study the response elements contained in the IL-12p40 sequence (Figures 3A and 3B). RAW 264.7 cells were transfected with various constructs of the IL-12p40 promoter containing 2 bp mutations in a luciferase reporter vector. These mutant promoter constructs have been described to induce loss of promoter activity in other models [24]. Site-directed mutagenesis of the C/EBP $\beta$ , NF- $\kappa$ B and ETS sites of the IL-12p40 promoter were unable to reverse the inhibitory effects of AEA on reporter vector activity (Figures 3C–3E). Interestingly, when RAW 264.7 cells were transiently transfected with constructs carrying a mutation on the GA-12 motif, AEA was unable to reverse LPS- and IFN $\gamma$ -induced activation of the p40 promoter (Figure 3F). These results strongly suggest that the main mechanism of action of AEA is activation of the GA-12 repressor site on the IL-12p40 promoter. To confirm the critical role of the GATA repressor element in inhibition by AEA, we performed decoy oligonucleotide assays. A decoy double-stranded oligonucleotide (with the sequence corresponding to the GATA sequence) was generated and transfected into RAW 264.7 cells in an attempt to interfere with binding of transcription factors modulated by AEA to their *cis*-acting elements within the IL-12p40 promoter sequence (Figure 4). The use of this decoy oligonucleotide completely blocked the effects of AEA on IL-12p40 promoter activity (Figure 4). To confirm further that this was a specific effect of the decoy sequence, we used a GATA sequence decoy oligonucleotide containing a 2 bp mutation as a control (Figure 4). The mutated decoy oligonucleotide was unable to reverse the effects of AEA on the down-regulation of IL-12p40 promoter activity. These results strongly suggest that AEA reverses LPS- and IFN $\gamma$ -induced IL-12p40 expression mainly by acting on the GA-12 repressor site.

### Interactions of AEA and the COX-2 pathway: inhibition of IL-12 p40 promoter activity by prostamide E<sub>2</sub> involves the activation of EP<sub>2</sub> (prostanoid receptor-type 2)

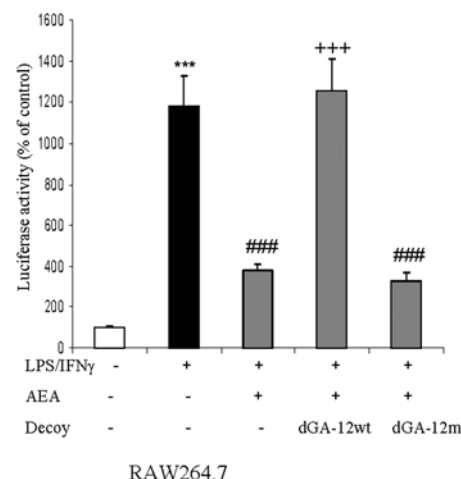
Overall, our results show that the inhibitory effect of AEA on the regulation of IL-12p40 gene transcription is mediated by a mechanism which is independent of activation of the CB<sub>1</sub> or CB<sub>2</sub> receptors. Previous evidence [21,28] indicates that COX-2 is capable of oxygenating eCB to generate new types of prostanoids, and thus COX-2 may recognize AEA and catalyse its conversion into prostaglandin endoperoxidase ethanolamides, such as prostamide E<sub>2</sub> (Figure 5A). The above findings prompted us to investigate the effects of prostamide E<sub>2</sub> in the regulation of IL-12 p40. First, we studied the effects of prostamide E<sub>2</sub> on the induction of p40, p35 and p19 subunits caused by both LPS and IFN $\gamma$  in primary microglial cells. As shown in Figure 5(B), prostamide E<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) markedly reversed the LPS- and IFN $\gamma$ -induced up-regulation of p40 mRNA expression, as observed by semi-quantitative RT-PCR. Interestingly, induction of the p35 and p19 genes was also reduced by prostamide E<sub>2</sub> (Figure 5B). In the following experiments, we then addressed whether prostamide

A

Decoy GA-12 wild type: 5'CTCGTTATTGATACACACACAGAGA3'  
(dGA-12 wt)

Decoy GA-12m: 5'CTCGTTATTCTACACACACAGAGA3'  
(dGA-12m)

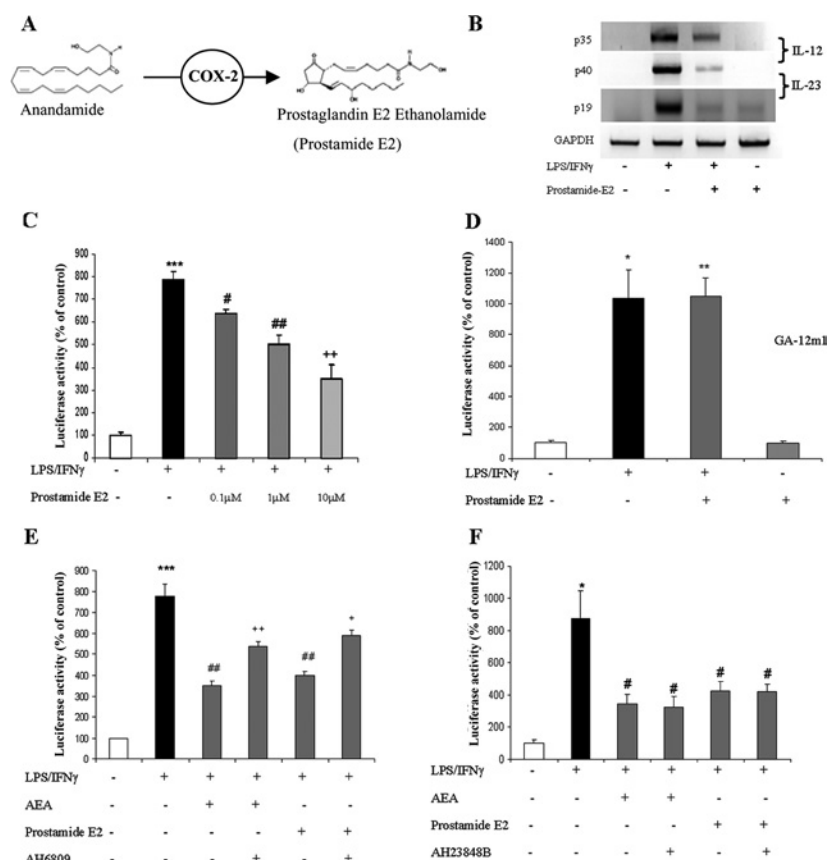
B



**Figure 4** Decoy GA-12 wild-type oligonucleotide is able to reverse the effects of AEA on the activation of the repressor site at the p40 promoter

(A) Sequences of the GA-12 wild-type (dGA-12wt) and mutated (dGA-12m) decoy double-stranded oligonucleotides used in this study. The residues which are mutated are underlined. (B) RAW 264.7 cells were transiently transfected with wild-type p40/pXP1 reporter gene construct with or without double-stranded decoy oligonucleotides corresponding to wild-type GA-12 (dGA-12wt) or 2 bp mutated GA-12 (dGA-12m) region. Co-transfection of GA-12 wild-type oligonucleotide with p40/pXP1 completely blocked the induction-reducing effects of 10  $\mu$ M AEA on p40 promoter activity, which was induced by both LPS and IFN $\gamma$  co-stimulation (LPS/IFN $\gamma$ ), whereas co-transfection of dGA-12m oligonucleotide with p40/pXP1 had no effect. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n=12$ ). \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ###,  $P < 0.001$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +++,  $P < 0.001$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + AEA.

E<sub>2</sub> could regulate IL-12p40 promoter activity. To analyse this, luciferase reporter gene assays were performed. As shown in Figure 5(C), p40 promoter activity induced by LPS and IFN $\gamma$  was decreased in a dose-dependent manner by prostamide E<sub>2</sub> (0.1, 1 and 10  $\mu$ M). We also showed that prostamide E<sub>2</sub> acts on the GA-12 repressor site on the IL-12p40 promoter. Thus when cells were transiently transfected with constructs carrying a mutated GA-12 motif, prostamide E<sub>2</sub> was unable to reverse LPS- and IFN $\gamma$ -induced activation of the p40 promoter (Figure 5D). It is well known that cells of the myeloid lineage express different types of prostanoid receptors. Therefore to investigate whether AEA-induced inhibitory effects on IL-12p40 promoter activity may involve the generation of prostamide E<sub>2</sub>, we used a pharmacological approach by treating cells with AH6809, an antagonist of EP<sub>2</sub>, as EP<sub>2</sub> is also known to be activated by prostamide E<sub>2</sub> [28]. AEA and prostamide E<sub>2</sub> were added alone or in the presence of AH6809, together with both LPS and IFN $\gamma$  in RAW 264.7 cells. As shown in Figure 5(E), the presence of AH6809 partially reversed the inhibitory effect of both AEA and prostamide E<sub>2</sub> on the transcriptional activity of IL-12p40. Interestingly, the effect of AEA was reversed in the same manner when EP<sub>2</sub> was antagonized, strongly suggesting that a proportion of the effects of AEA are mediated by EP<sub>2</sub> activation. EP<sub>4</sub> does



**Figure 5** Prostamide E $_2$  reduces IL-12p40 promoter activity by activating the repressor site GA-12: involvement of EP $_2$

(A) Scheme showing the metabolic pathway by which AEA is converted into prostamide E $_2$ . (B) Microglial cells which were stimulated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ ) showed an increase in the expression of p35, p40 and p19 subunits at the mRNA level. When co-treated with prostamide E $_2$  (10  $\mu$ M), this induction was reduced. (C) RAW 264.7 cells were transiently transfected with p40/pGL2B reporter gene construct. Cells were left unstimulated or treated with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) in the presence or absence of different doses of prostamide E $_2$  (0.1, 1 or 10  $\mu$ M). Prostamide E $_2$  reduced p40 promoter activity in a dose-dependent fashion. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; #,  $P < 0.02$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; ##,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.005$  compared with LPS and IFN $\gamma$ . (D) RAW 264.7 cells were transiently transfected with wild-type p40/pXP1 reporter gene construct and transfected with or without double-stranded decoy oligonucleotides corresponding to the GA-12 wild-type or 2 bp mutated (GA-12m1) sequence. Co-transfection of dGA-12wt with p40/pXP1 completely blocked the reducing effects of 10  $\mu$ M AEA on the induction of p40 promoter activity [induced by LPS and IFN $\gamma$  co-treatment (LPS/IFN $\gamma$ )], whereas co-transfection of GA-12m1 with p40/pXP1 had no effect on AEA downregulation of p40 promoter activity. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*\*,  $P < 0.001$  compared with control; \*,  $P < 0.001$  compared with control. (E) RAW 264.7 cells were transiently transfected with wild-type p40/pXP1 reporter gene construct. Transfected cells were left unstimulated or treated with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) in the presence or absence of AEA (10  $\mu$ M) or prostamide E $_2$  (10  $\mu$ M). Pre-treatment with the EP $_2$  antagonist AH6809 (10  $\mu$ M) partially reversed the effects of AEA and prostamide E $_2$  on p40 promoter activity. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ##,  $P < 0.003$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; ++,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + AEA; +,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + prostamide E $_2$ . (F) RAW 264.7 cells were transiently transfected with wild-type p40/pXP1 reporter gene construct. Transfected cells were left unstimulated or treated with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ) in the presence or absence of AEA (10  $\mu$ M) or prostamide E $_2$  (10  $\mu$ M). Pre-treatment with the EP $_4$  antagonist AH23848B (30  $\mu$ M) did not modify the effects of AEA and prostamide E $_2$  on p40 promoter activity. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n = 12$ ). \*,  $P < 0.02$  compared with control; #,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$ .

not seem to be involved, since treatment with the EP $_4$  antagonist AH23848B did not modify the inhibitory effects of AEA or prostamide E $_2$  on IL-12p40 gene transcription (Figure 5F). These results suggest that AEA could exert part of its effects on the regulation of IL-12p40 gene transcription by the generation of prostamide E $_2$ .

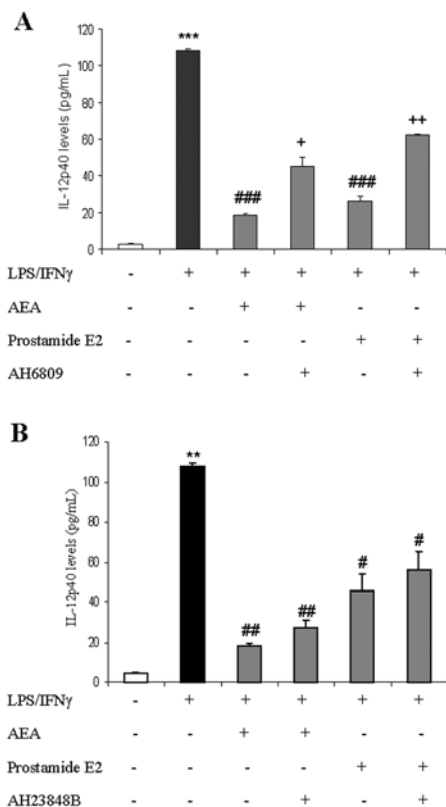
#### AEA and prostamide E $_2$ down-regulate the induction of IL-12p40 protein by LPS- and IFN $\gamma$ -activated microglia

Next, we attempted to delineate AEA and prostamide E $_2$  actions at the IL-12p40 protein level. AEA (10  $\mu$ M) inhibited LPS- and IFN $\gamma$ -mediated up-regulation of p40 protein in primary microglial cell cultures, as evaluated by ELISAs on tissue-culture medium supernatant (Figure 6A). To explore whether AEA-induced inhibition of IL-12p40 protein synthesis may involve

prostanoids, we co-treated microglial cells with both LPS and IFN $\gamma$ , and AEA or prostamide E $_2$  in the presence or absence of the EP $_2$  antagonist AH6809. When we antagonized EP $_2$  on AEA-treated microglia, a partial reversion of AEA effects on the production of IL-12p40 protein was observed in cells stimulated by LPS and IFN $\gamma$ , as similarly seen following the addition of prostamide E $_2$  (Figure 6A). Again, treatment with the EP $_4$  antagonist AH23848B (Figure 6B) was unable to modify AEA or prostamide E $_2$  effects on IL-12p40 protein expression.

#### Inhibition of the COX-2 pathway reverses the effects of AEA on both p40 promoter activity and IL-12p40 expression

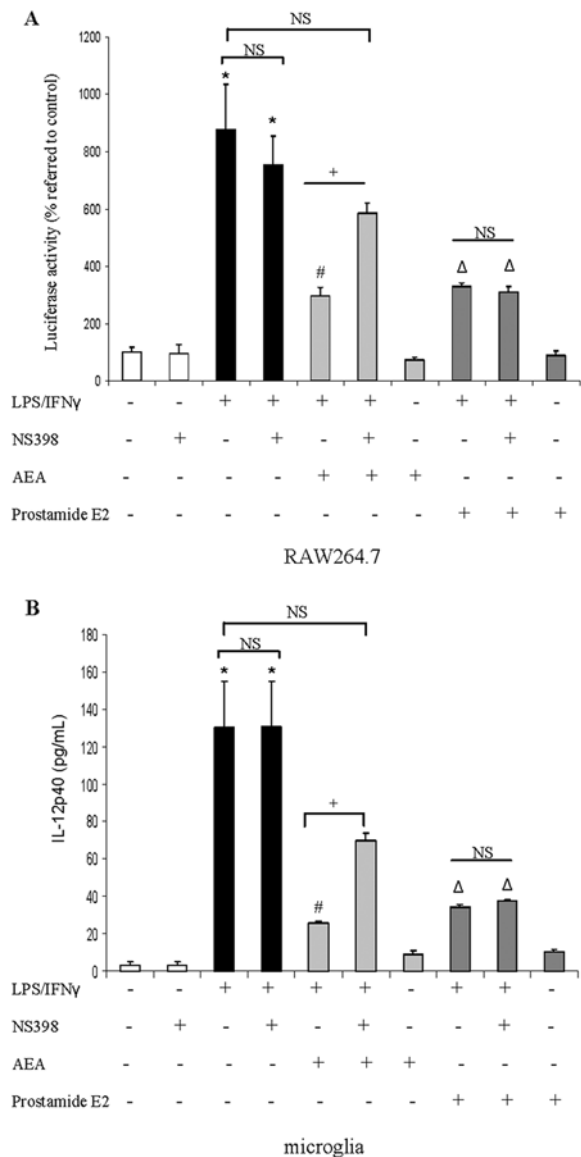
Since both AEA and prostamide E $_2$  modulate IL-12p40 at both the protein and promoter levels, and AEA can be oxygenated by COX-2 to generate prostamides, we postulated that inhibition



**Figure 6 Prostamide E<sub>2</sub> negatively modulates p40 protein levels in activated microglial cells**

(A) Microglial cells were co-treated overnight with both LPS and IFN $\gamma$  (LPS/IFN $\gamma$ ) and with AEA (10  $\mu$ M), prostamide E<sub>2</sub> (10  $\mu$ M) and/or EP<sub>2</sub> antagonist AH6809 (10  $\mu$ M). Antagonism of EP<sub>2</sub> partially blocked the effects of both AEA and prostamide E<sub>2</sub> on p40 protein expression. Supernatants were collected and p40 protein was measured by ELISA. Results are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ), with each experiment performed in triplicate. \*\*\*,  $P < 0.001$  compared with control; ###,  $P < 0.001$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + AEA; ++,  $P < 0.005$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + prostamide E<sub>2</sub>. (B) When microglial cells were pre-treated with the EP<sub>2</sub> antagonist AH23848B (30  $\mu$ M), there was no modification of the effects of 10  $\mu$ M AEA and 10  $\mu$ M prostamide E<sub>2</sub> on p40 protein expression as measured by ELISA. Results are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ), with each experiment performed in triplicate. \*\*,  $P < 0.002$  compared with control; #,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; ##,  $P < 0.005$  compared with LPS and IFN $\gamma$ .

of COX-2 could result in a reversion of AEA effects on the IL-12p40 promoter. We thus treated RAW 264.7 cells with the COX-2-specific inhibitor NS-398. In support of the contribution of COX-2 to AEA actions, the treatment of activated RAW 264.7 cells with 10  $\mu$ M NS-398 significantly reversed the inhibition of p40 promoter activity by AEA (Figure 7A). Interestingly, NS-398 had no effect by itself and did not modify the p40 promoter activity when co-treated with both LPS and IFN $\gamma$ . In addition, the presence of 10  $\mu$ M NS-398 was unable to reverse the effects of prostamide E<sub>2</sub>, a downstream metabolite in the COX-2 pathway (Figure 7A). We further confirmed these results at the protein level in primary microglial cells, obtaining similar results to those of p40 promoter activity (Figure 7B). Again, COX-2 inhibition with 10  $\mu$ M NS-398 reversed the effects of AEA on IL-12p40 protein expression and had no effect by itself, in the presence of LPS and IFN $\gamma$  and with prostamide E<sub>2</sub> (Figure 7B). Overall, these results highlight the contribution of COX-2 to AEA actions.



**Figure 7 Pharmacological inhibition of COX-2 reverses the effect of AEA both at protein and promoter levels**

(A) RAW 264.7 cells were transiently transfected with a reporter gene construct containing the wild-type p40 promoter. Cells were stimulated for 18 h with both LPS and IFN $\gamma$  concurrently (LPS/IFN $\gamma$ ), and with AEA (10  $\mu$ M) or prostamide E<sub>2</sub> (10  $\mu$ M), in the presence or absence of the specific COX-2 inhibitor NS-398 (NS398; 10  $\mu$ M), prior to luciferase activity measurement. Results are means  $\pm$  S.E.M. of luciferase activity ( $n=9$ ). \*,  $P < 0.05$  compared with control; #,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + AEA;  $\Delta$ ,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ . (B) IL-12p40 protein expression of microglia treated with NS-398 (NS398; 10  $\mu$ M). COX-2 inhibition significantly reduced the magnitude of AEA (10  $\mu$ M) inhibition on IL-12p40 protein expression (as measured by ELISA), whereas there was no effect on prostamide E<sub>2</sub> action, supporting the involvement of this enzyme in the effects of AEA. Results are means  $\pm$  S.E.M. ( $n=3$ ), with each experiment performed in triplicate. \*,  $P < 0.05$  compared with control; #,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ ; +,  $P < 0.05$  compared with LPS and IFN $\gamma$  + AEA;  $\Delta$ ,  $P < 0.01$  compared with LPS and IFN $\gamma$ .

## DISCUSSION

CB compounds were previously demonstrated to reduce the development of CREAE (chronic relapsing-remitting experimental autoimmune encephalomyelitis) and TMEV models of MS [4–6]. Chronically-activated microglia and astrocytes produce pro-inflammatory molecules that may contribute to the loss of

oligodendrocytes, which are compromised in MS. Previously, our group and others have reported that CB agonists inhibit the production of pro-inflammatory molecules by CNS glial cells [7, 29–31]. In the present study, we addressed the question of whether AEA might be involved in the regulation of IL-12 and related cytokines on microglial cells, which are capable of producing eCBs during CNS inflammation [18,19]. This is of interest because of the role these cytokines play in the induction and maintenance phases of autoimmune inflammatory demyelination [32,33].

Our results show that activated microglial cells express the p19, p35 and p40 subunits, therefore making the formation of IL-12 and IL-23 possible, and then raising the possibility that microglia may contribute to Th1-skewing within the CNS. In addition, for the first time, we demonstrated that AEA is a potent inhibitor of mRNA expression of p19, p35 and p40 subunits and of IL-12p40 protein release by activated microglia. IL-12 (p35/p40 subunits) and IL-23 (p19/p40 subunits) are known to play a crucial role in the development of EAE [34]. Thus our results support the involvement of the eCB system in the modulation of neuroinflammatory processes, in line with its ability to limit the immune response in animal models of MS.

The mechanisms by which AEA inhibit the production of IL-12 family cytokines in activated microglia are unknown. Because the p40 subunit is shared by both IL-12 and IL-23, we concentrated our studies from a mechanistic point of view on its regulation. In activated cells, C/EBP, NF- $\kappa$ B and ETS are some of the enhancer sites in the p40 promoter that may up-regulate the expression of this subunit [24]. In contrast, in resting cells, there is a constitutively activated repressor site, called GA-12. In an approach aimed at understanding p40 promoter regulation by AEA, we performed site-directed mutagenesis experiments in regions of the IL-12p40 promoter. We observed that mutations within the core region of the GA-12 site abolished the ability of this mutated construct to respond to AEA, strongly suggesting that the mechanism of action of AEA is related to the activation of this repressor site of the IL-12p40 promoter. Furthermore, decoy oligonucleotide experiments also support the idea that AEA down-regulates IL-12p40 expression by acting on GA-12. Our data demonstrate for the first time that AEA-mediated down-regulation of p40 promoter activity suggests a mechanism in which the GA-12 repressor site is critical.

Studies on the regulation of the IL-12p40 promoter indicated that AEA suppression of IL-12p40 promoter activity was independent of both CB<sub>1</sub> and CB<sub>2</sub> receptor activation. Although functional interactions between the eCB and vanilloid systems have been postulated [27], our results also indicate a lack of involvement of the vanilloid system in AEA-induced suppression of IL-12p40. At this point, it is interesting to note that prostamide E<sub>2</sub>, an active metabolite of AEA through COX-2 activity [35], was able to down-regulate the transcriptional activity of IL-12p40 in a dose-dependent manner. Although little is known about the mechanisms of prostamide E<sub>2</sub>-induced biological actions, it is capable of activating the prostanoid receptor EP<sub>2</sub> [28]. Supporting this, prostamide E<sub>2</sub>-induced reversion of IL-12p40 gene transcription by LPS and IFN $\gamma$  was attenuated by pretreatment with the prostanoid EP<sub>2</sub> antagonist. It is important to note that the EP<sub>2</sub> antagonist AH6809 also caused a partial but significant attenuation of AEA-mediated inhibition of IL-12p40 transcriptional activity and protein secretion. Moreover, AH6809 was as efficient in reversing the effects of AEA as was prostamide E<sub>2</sub>, which would suggest that these compounds share signalling mechanisms. Therefore the production of prostamide E<sub>2</sub> through metabolism of AEA by COX-2 could mediate a proportion of the effects of AEA on IL-12 p40 regulation. Pretreatment with

the EP<sub>4</sub> prostanoid receptor antagonist was ineffective, indicating the specificity of the effects of EP<sub>2</sub>s. However, we cannot exclude the involvement of other mechanisms for AEA action in IL-12 p40 regulation, including the existence of unknown CB receptors for AEA [36], or the participation of lipid rafts. The up-regulation of COX-2 may be important in terms of favouring the oxygenation of AEA and generation of prostamide E<sub>2</sub>, which would contribute to the inhibition of IL-12p40. If COX-2 plays a role in the metabolism of AEA and generates prostamide E<sub>2</sub> which, in turn, contributes to the inhibition of IL-12p40, then inhibition of COX-2 should produce a positive influence on IL-12p40 production. The suppressive effects of AEA on IL-12p40 levels were observed to be attenuated after treatment with the specific COX-2 inhibitor NS-398, but there was no inhibition of the effects of prostamide E<sub>2</sub>. Therefore we suggest that during inflammation, over-expression of COX-2 may drive AEA metabolism towards a derived prostanoid, prostamide E<sub>2</sub>, which may contribute to the negative regulation of IL-12p40 production. Supporting this, the results by Rockwell and Kaminski [37] show that AEA caused a concentration-dependent inhibition of IL-2 by murine splenocytes through the generation of a COX-2 metabolite of AEA, independently of CB<sub>1</sub>/CB<sub>2</sub> activation.

In the present study, AEA concentrations were used at the low micromolar range (1–15  $\mu$ M), in agreement with doses reported in other studies [37–39]. Even though AEA levels in rat and human plasma have been detected in the low nanomolar range, the local concentrations of AEA under pathological conditions could be higher. In addition, AEA has usually been measured in normal healthy tissue and plasma samples, whereas these levels differ substantially in inflamed or damaged tissues [19].

The eCB system is highly activated during CNS inflammation [19]. Microglial cells are capable of producing eCBs during CNS inflammation [18,19], and the different components of eCBs are regulated in brain cells from MS patients [40]. Activation of the eCB system may represent a mechanism for controlling excessive inflammation. The inhibition of IL-12p40 may help to control and limit the local immune response in order to prevent over-activation of cellular immunity. Our results also suggest that excessive COX-2 resulting from inflammation has a significant impact on eCB-derived prostanoid signalling in immune reactivity.

Here, we present evidence that the repressor element GA-12 is critical for AEA-mediated down-regulation of IL-12p40 promoter activity. Although the physiological relevance of these findings needs to be established, *in vivo* production of prostamide E<sub>2</sub> has been described as occurring after AEA administration, especially in the case of FAAH knockout mice [41]. The identification of the mechanisms underlying the limiting effects of eCBs on the production of pro-inflammatory cytokines such as IL-12p40 may provide insights relevant for consideration of the eCB system as a novel and promising target for therapeutic treatment of autoimmune or chronic inflammatory diseases. Our observations in microglial cells suggest that it may be of interest to study whether eCBs can regulate IL-12 and IL-23 and then coordinate Th1/Th2 responses on CNS autoimmune diseases, such as MS. Further studies are warranted to answer this question.

We thank Dr Stephen T. Smale (Howard Hughes Medical Institute and Department of Microbiology, Immunology and Molecular Genetics, UCLA, Los Angeles, CA, U.S.A.) for the gift of the p40/pGL2 plasmid construct, and GSK (GlaxoSmithKline) for providing us with the EP<sub>4</sub> antagonist AH23848B. We also thank Elisa Baides Rosell and Joaquín Sancho (Neuroimmunology Group, Functional and Systems Neurobiology Department, Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain) for excellent technical support. This work was supported by grants from the MEC (Ministerio de Educación y Cultura; SAF 2004/00416). F.C. is a Research Fellow of the Comunidad Autónoma de Madrid.

## REFERENCES

- Lambert, D. M. and Fowler, C. J. (2005) The endocannabinoid system: drug targets, lead compounds, and potential therapeutic applications. *J. Med. Chem.* **48**, 5059–5087
- Klein, T. W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 400–411
- Aloisi, F. (2001) Immune function of microglia. *Glia* **36**, 165–179
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Huffman, J. W. and Layward, L. (2000) Cannabinoids control spasticity and tremor in a multiple sclerosis model. *Nature* **404**, 84–87
- Arévalo-Martín, A., Vela, J. M., Molina-Holgado, E., Borrell, J. and Guaza, C. (2003) Therapeutic action of cannabinoids in a murine model of multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **23**, 2511–2516
- Croxford, J. L. and Miller, S. D. (2003) Immunoregulation of a viral Model of Multiple sclerosis using the synthetic cannabinoid R(+)-WIN55,212. *J. Clin. Invest.* **111**, 1231–1240
- Baker, D., Pryce, G., Croxford, J. L., Brown, P., Pertwee, R. G., Makriyannis, A., Khanolkar, A., Layward, L., Fezza, F., Bisogno, T. and Di Marzo, V. (2001) Endocannabinoids control spasticity in a multiple sclerosis model. *FASEB J.* **15**, 300–302
- Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E., Arévalo-Martín, A., Correa, F., Vaso, A., López-Rodríguez, M. L., Di Marzo, V. and Guaza, C. (2005) Activation of the endocannabinoid system as a therapeutic approach in a murine model of multiple sclerosis. *FASEB J.* **19**, 1338–1340
- Mestre, L., Correa, F., Arévalo-Martín, A., Molina-Holgado, E., Valenti, M., Ortas, G., Di Marzo, V. and Guaza, C. (2005) Pharmacological modulation of the endocannabinoid system in a viral model of multiple sclerosis. *J. Neurochem.* **92**, 1327–1339
- Trinchieri, G. (2003) Interleukin-12 and the regulation of innate resistance and adaptive immunity. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 133–146
- Li, J., Gran, B., Zhang, G. X., Ventura, E. S., Siglienti, I., Rostami, A. and Kamoun, M. (2003) Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia. *J. Neurol. Sci.* **215**, 95–103
- Belladonna, M. L., Renaud, J. C., Bianchi, R., Vacca, C., Fallarino, F., Orabona, C., Fioretti, M. C., Grohmann, U. and Puccetti, P. (2002) IL-23 and IL-12 have overlapping, but distinct, effects on murine dendritic cells. *J. Immunol.* **168**, 5448–5454
- Balashov, K. E., Smith, D. R., Khoury, S. J., Hafner, D. A. and Weiner, H. L. (1997) Increased interleukin 12 production in progressive multiple sclerosis: induction by activated CD4+ T cells via CD40 ligand. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **94**, 599–603
- Lu, T., Newton, C., Perkins, I., Friedman, H. and Klein, T. W. (2006) Role of cannabinoid receptors on  $\Delta 9$  tetrahydrocannabinol suppression of IL-12p40 in mouse bone marrow derived dendritic cells infected with *Legionella pneumophila*. *Eur. J. Pharmacol.* **532**, 170–177
- Matias, I., Pochard, P., Orlando, P., Salzet, M., Pestel, J. and Di Marzo, V. (2002) Presence and regulation of the endocannabinoid system in human dendritic cells. *Eur. J. Biochem.* **269**, 3771–3778
- Di Marzo, V., Fontana, A., Cadas, H., Schinelli, S., Cimino, G., Schwartz, J. C. and Piomelli, D. (1994) Formation and inactivation of endogenous cannabinoid anandamide in central neurons. *Nature* **372**, 686–691
- Walter, L., Franklin, A., Witting, A., Moller, T. and Stella, N. (2002) Astrocytes in culture produce anandamide and other acylethanolamides. *J. Biol. Chem.* **277**, 20869–20876
- Carrier, E. J., Kearn, C. S., Barkmeier, A. J., Breese, N. M., Yang, W., Nithipathikorn, K., Pfister, S. L., Campbell, W. B. and Hillard, C. J. (2004) Cultured rat microglial synthesize the endocannabinoid 2-arachidonylglycerol, which increases proliferation via a CB2 receptor-mediated mechanism. *Mol. Pharmacol.* **65**, 999–1007
- Eljaschewitsch, E., Witting, A., Mawrin, C., Lee, T., Schmidt, P. M., Wolf, S., Hoertnagl, H., Raine, C. S., Schneider-Stock, R., Nitsch, R. and Ullrich, O. (2006) The endocannabinoid anandamide protects neurons during CNS inflammation by induction of MKP-1 in microglial cells. *Neuron* **49**, 67–79
- Cravatt, B. F., Giang, D. K., Mayfield, S. P., Boger, D. L., Lerner, R. A. and Gilula, N. B. (1996) Molecular characterization of an enzyme that degrades neuromodulatory fatty-acid amides. *Nature* **384**, 83–87
- Ross, R. A., Craib, S. J., Stevenson, L. A., Pertwee, R. G., Henderson, A., Toole, J. and Ellington, H. C. (2002) Pharmacological characterization of the anandamide cyclooxygenase metabolite: prostaglandin  $E_2$  ethanolamide. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **301**, 900–907
- Molina-Holgado, E., Vela, J. M., Arévalo-Martín, A., Almazán, G., Molina-Holgado, F., Borrell, J. and Guaza, C. (2002) Cannabinoids promote oligodendrocyte progenitor survival: involvement of cannabinoid receptors and phosphatidylinositol-3 kinase/Akt signaling. *J. Neurosci.* **22**, 9742–9753
- Plevy, S. E., Gemberling, J. H., Hsu, S., Dorner, A. J. and Smale, S. T. (1997) Multiple control elements mediate activation of the murine and human interleukin 12 p40 promoters: evidence of functional synergy between C/EBP and Rel proteins. *Mol. Cell. Biol.* **17**, 4572–4588
- Becker, C., Wirtz, S., Ma, X., Blessing, M., Galle, P. R. and Neurath, M. F. (2001) Regulation of IL-12 p40 promoter activity in primary human monocytes: roles of NF- $\kappa$ B, CCAAT/Enhancer-Binding Protein  $\beta$ , and PU.1 and identification of a novel repressor element (GA-12) that responds to IL-4 and prostaglandin  $E_2$ . *J. Immunol.* **167**, 2608–2618
- Luo, Q., Ma, X., Wahl, S. M., Bieker, J. J., Crossley, M. and Montaner, L. J. (2004) Activation and repression of interleukin-12 p40 transcription by erythroid kruppel-like factor in macrophages. *J. Biol. Chem.* **279**, 18451–18456
- Carlisle, S. J., Marciano-Cabral, F., Stabb, A., Ludwick, C. and Cabral, C. A. (2002) Differential expression of the CB2 cannabinoid receptor by rodent macrophage-like cells in relation to cell activation. *Int. Immunopharmacol.* **2**, 69–82
- Zygmunt, P. M., Petersson, J., Andersson, D. A., Chuang, H., Sorgard, M., Di Marzo, V., Julius, D. and Hogestatt, E. D. (1999) Vanilloid receptors on sensory nerves mediate the vasodilator action of anandamide. *Nature* **400**, 452–457
- Matias, I., Chen, J., De Petrocellis, L., Bisogno, T., Ligresti, A., Fezza, F., Krauss, A. H., Shi, L., Protzman, C. E., Li, C. et al. (2004) Prostaglandin ethanolamides (prostamides): *in vitro* pharmacology and metabolism. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **309**, 745–757
- Molina-Holgado, F., Molina-Holgado, E., Guaza, C. and Rothwell, N. J. (2002) Role of CB1 and CB2 receptors in the inhibitory effects of cannabinoids on lipopolysaccharide-induced nitric oxide release in astrocyte cultures. *J. Neurosci. Res.* **81**, 1242–1252
- Ortega-Gutiérrez, S., Molina-Holgado, E. and Guaza, C. (2005) Effect of anandamide uptake inhibition in the production of nitric oxide and in the release of cytokines in astrocyte cultures. *Glia* **52**, 163–168
- Fachinetti, F., Del Giudice, G., Furegato, S., Passarotto, M. and Leon, M. (2003) Cannabinoids ablate release of TNF $\alpha$  in rat microglial cells stimulated with lipopolysaccharide. *Glia* **41**, 161–168
- Nicoletti, F., Patti, F., Cocuzza, C., Zacccone, P., Nicoletti, A., Di Marco, R. and Reggio, A. (1996) Elevated serum levels of interleukin-12 in chronic progressive multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **70**, 87–90
- Hart, B. A., Brok, H. P., Remarque, E., Benson, J., Treacy, G., Amor, S., Hintzen, R. Q., Laman, J. D., Bauer, J. and Blezer, E. L. (2005) Suppression of ongoing disease in a nonhuman primate model of multiple sclerosis by a human-anti-human IL-12p40 antibody. *J. Immunol.* **175**, 4761–4768
- Cua, D. J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C. A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T. et al. (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748
- Fowler, C. J. (2007) The contribution of cyclooxygenase-2 to endocannabinoid metabolism and action. *Br. J. Pharmacol.* **152**, 594–601
- Di Marzo, V., De Petrocellis, L., Fezza, F., Ligresti, A. and Bisogno, T. (2002) Anandamide receptors. *Prostaglandins Leukot. Essent. Fatty Acids* **66**, 377–391
- Rockwell, C. E. and Kaminski, N. E. (2004) A cyclooxygenase metabolite of anandamide causes inhibition of interleukin-2 secretion in murine splenocytes. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **311**, 683–690
- Bouaboula, M., Hilalret, S., Marchand, J., Fajas, L., Le Fur, G. and Casellas, P. (2005) Anandamide induced PPAR $\gamma$  transcriptional activation and 3T3-L1 preadipocyte differentiation. *Eur. J. Pharmacol.* **517**, 174–181
- Snider, N. T., Kornilov, A. M., Kent, U. M. and Hollenberg, P. F. (2007) Anandamide metabolism by human liver and kidney microsomal cytochrome p450 enzymes to form hydroxyecosatetraenoic and epoxyecosatrienoic acid ethanolamides. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* **321**, 590–597
- Benito, C., Romero, J. P., Tolón, R. M., Clemente, D., Docagne, F., Hillard, C. J., Guaza, C. and Romero, J. (2007) Cannabinoid CB1 and CB2 receptors and fatty acid amide hydrolase are specific markers of plaque cell subtypes in human multiple sclerosis. *J. Neurosci.* **27**, 23396–23402
- Weber, A., Ni, J., Ling, K. H., Acheampoung, A., Tang-Lin, D. D., Burk, R. R., Cravatt, B. and Woodward, D. (2004) Formation of prostamides from anandamide in FAAH knockout mice analysing by HPLC with tandem mass spectrometry. *J. Lipid. Res.* **45**, 757–763

Received 27 September 2007; accepted 25 October 2007

Published as BJ Immediate Publication 25 October 2007, doi:10.1042/BJ20071329